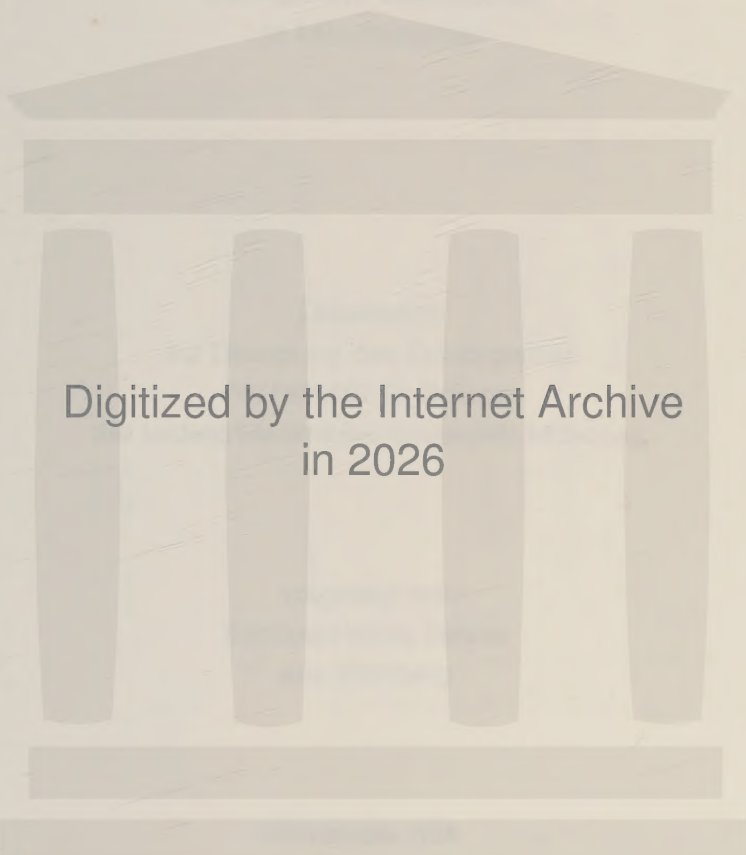


**IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG
DES ADP/ATP TRANSLOKATORS
IN MITOCHONDRIEN**

BERNHARD-MARIA SEITNER

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Immunologische Charakterisierung
des ADP/ATP Translokators
in Mitochondrien

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Bernhard-Maria Seitner
aus Nürnberg

November 1988

1. Gutachter: Prof. W. Gutensohn
 2. Gutachter: Prof. H. Cleve
- Sondergutachter: Prof. M. Klingenberg

Tag der mündl. Prüfung: 16. Juni 1989

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

百聞は一見に
かず



Einmal selbst sehen
ist mehr wert als
hundert Neuigkeiten hören

**Diese Arbeit ist
meinem lieben Vater,
Konrad Seitner,
gewidmet.**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Allgemeines über den ADP/ATP Carrier in Mitochondrien	1
1.2.	Immunologische Erkenntnisse über den ADP/ATP Translokator	3
1.3.	Die Bedeutung des AAC im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen	3
1.4.	Wissensstand über die Topologie am AAC	6
1.5.	Problemstellung	8
2.	Material und Methoden	
2.1.	Verwendete Chemikalien und Geräte	10
2.2.	Methoden	
2.2.1.	Analytische Methoden	12
2.2.2.	Allgemeine und präparative Methoden	12
2.2.3.	Immunisierung, Fusion und Klonierung von Hybridomazellen	14
2.2.4.	Gewinnung und Reinigung von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen	15
2.2.5.	Quantitativer RIA-Immunoblot	16
2.2.6.	Immunoblot und Elisa-Testsysteme	18
3.	Ergebnisse	
3.1.	Charakterisierung der polyklonalen Antikörper gegen den Nukleotidcarrier	23
3.1.1.	Untersuchungen zur Organspezifität mit Hilfe des quantitativen RIA-Immunoblot	24
3.1.2.	Charakterisierung der Antiseren gegen AAC mit den homologen Antigenen AAC, UCP, PiC und ADPase im Elisa	27
3.1.3.	Titration des VDLR-IgG und des Cardiolipin-Antisera mit nativem CAT-AAC	28
3.1.4.	Bestimmung der Spezifität von Kaninchenserum gegen verschiedene Carrier mittels Immunoblot	31
3.2.	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen den Nukleotidcarrier	36

3.2.1.	Auswahlverfahren der Mäuse nach funktionellen Kriterien	36
3.2.2.	Auswahl der mit SDS-AAC immunisierten Mäuse für die Fusion	41
3.2.3.	Test der selektierten und bindenden CAT-AAK-mAk im ADP/ATP Austausch	43
3.2.4.	Selektion von funktionellen IgM/IgG - "Switch"-Varianten mittels Elisa	46
3.2.5.	Charakterisierung der IgM-mAk mit Bindungsspezifität für CAT-AAC	47
3.2.6.	Kompetitiver Elisa von gereinigtem CAT-AAC-IgG-mAk zum Nachweis der Cardiolipin-Spezifität	51
3.2.7.	Untersuchungen zur molekularen Mimikry eines kreuzreagierenden IgG-mAk gegen den variablen Teil der λ -Kette eines humanen IgG	54
3.2.8.	Titration von SDS-AAC-mAk im Elisa	55
3.2.9.	Kompetitive Epitopbindungsanalyse von ausgewählten SDS-AAC-mAk	56
3.2.10.	Dekorierung der SDS- und CAT-AAC-mAk an mitochondrialen Rinderherz-Extrakten nach Immunoblot	60
3.2.11.	Test auf die Spezifität gegen unterschiedliche Carrier-Antigene nach Immunoblot	61
3.2.12.	Bindungsversuche einiger monoklonaler Antikörper an den Säurespaltstücken A ₁ und A ₂ des Rinderherz-AAC	63
3.3.	Monoklonale Antikörper gegen SDS-UCP	64
3.3.1.	Auswahl der Mäuse für die Fusion mit Hilfe von Immunoblots gegen CNBr-Fragmente des SDS-UCP	64
3.3.2.	Immunologisches Verhalten der monoklonalen Antikörper, die gegen SDS-denaturiertes Uncoupling Protein gerichtet sind	65
3.3.3.	Test der SDS-UCP-selektierten Hybridomaklone auf Reaktion mit mitochondrialen Triton-Extrakten im Immunoblot	66
3.3.4.	Ermittlung der Spezifität der SDS-UCP-mAk durch einen kompetitiven Immunoblot gegen SDS-UCP, -AAC, - ATPase und gegen Cardiopilin	67

3.3.5.	Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der verschiedenen Carrier-Antigene mit Hilfe des Immunoblots	69
4.	Diskussion	
4.1.	Charakterisierung der polyklonalen Antikörper gegen den ADP/ATP Carrier	71
4.2.	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen den AAC	73
4.3.	Monoklonale Antikörper gegen SDS-UCP	85
4.4.	Ausblick auf künftige Arbeiten	85
5.	Zusammenfassung	87
6.	Verzeichnis der Abkürzungen	91
7.	Anhang	92
8.	Literaturverzeichnis	101



1. Einleitung

1.1. Allgemeines über den ADP/ATP Carrier in Mitochondrien

In der inneren Mitochondrienmembran ist eine Vielzahl von Enzymen vertreten, deren Hauptaufgabe in der Oxidation von Substraten und in der Phosphorylierung von ADP zu ATP liegt. Diese Substrate spielen eine wichtige Rolle als Intermediate für einen funktionierenden Stoffwechsel. Zu den wichtigsten Metaboliten im gesamten Stoffwechsel gehört das ATP, das durch Phosphorylierung von ADP im Matrixraum gebildet wird. Bei diesem Phosphorylierungsprozess nutzt die ATPase das elektrochemische Potential, welches die Proteine der Atmungskette über der inneren Mitochondrienmembran gebildet haben.

Der ADP/ATP Carrier (AAC) transportiert die großen Mengen an gebildetem ATP durch die innere Mitochondrienmembran. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, beträgt der Anteil dieses Carriers ungefähr 12% der gesamten Proteinmasse der Mitochondrien. Er gehört damit zu den wichtigsten Transportproteinen in den Mitochondrien. Wegen der besonderen Leistung, die das Herzmuskelgewebe erbringen muß, kommt er in diesem Gewebe in besonders großer Menge und mit erhöhter Aktivität vor. In Abb. 1 ist die Lage des Translokators in der inneren Mitochondrienmembran, sowie seine Integrierung in Phosphattransport- und Phosphorylierungsprozesse, dargestellt.

Der ADP/ATP Carrier ist ein 65 kD großes, dimeres und integrales Membranprotein. Die gegenwärtige Vorstellung über den Mechanismus der Translokation besagt, daß sich die Nukleotidbindungsstelle von der cytosolischen Seite der Membran (c-Zustand) auf die Matrix-Seite (m-Zustand) der Membran verschiebt (Vignais 1985, Klingenberg et al. 1976).

Der Nukleotidcarrier bindet im c-Zustand den spezifischen Inhibitor Carboxyatratkylosid (CAT), sowie das strukturell geringfügig abweichende Atraktylosid (ATR). Nach Übergang in den m-Zustand zeigt das Carrierprotein eine Spezifität der Bindung für Bonkreat (BKA). Dabei beeinflusst ADP bzw. ATP katalytisch den Konformationswechsel des Nukleotidcarriers (Klingenberg 1986). Dieser Transportprozess wird als "single-site gated-pore Mechanismus" bezeichnet (Klingenberg et al. 1985).

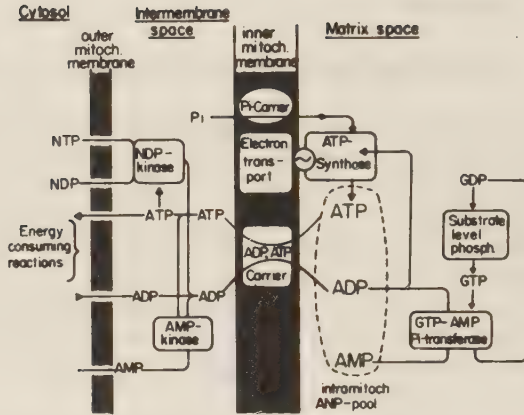


Abb.1 Die zentrale Rolle des ADP/ATP Carriers für die bioenergetischen Prozesse in den Mitochondrien

Unter Verwendung von Detergentien konnte der AAC mit Hilfe der gebundenen Inhibitoren CAT, ATR und BKA aus der Membran gelöst und mittels Hydroxylapatit-Chromatographie gereinigt werden (Riccio et al. 1975; Aquila et al. 1978).

Die Sequenz des Rinderherz-AAC wurde erstmalig von Aquila et al. (1982) aufgeklärt. In den letzten Jahren folgten die Sequenzen von *Neurospora crassa*-AAC (Arends et al. 1984), Hefe-AAC (Adrian et al. 1986), Mais-AAC (Baker et al. 1985), humanem Skelettmuskel-AAC (Neckelmann et al. 1987), Fibroblasten-AAC (Battini et al. 1987) und humanem Leber-AAC (Houldsworth et al. 1988).

Im Falle des humanen ADP/ATP Carrierproteins konnten Battini et al. (1987) die für die Regulation der Expression verantwortlichen Gene lokalisieren. Bei Expression dieser Gene können verschiedene Wachstumsfaktoren ihren Einfluß ausüben. Rasmussen et al. (1986) und Neckelmann et al. (1987) wiesen auf die Existenz von zwei verschiedenen AAC-c-DNA's H_1 und H_2 hin. Für den AAC aus Lebermitochondrien konnten Houldsworth et al. (1988) die Existenz einer dritten c-DNA bestätigen. Neckelmann et al. (1987) deuteten die Möglichkeit an, daß Unterschiede in der Expression der dafür verantwortlichen Gene für die von Schultheiss (1986) geforderte unterschiedliche Antigenität des AAC verantwortlich sind.

1.2. Immunologische Erkenntnisse über den ADP/ATP Carrier

Buchanan et al. (1976) zeigten erstmals die deutliche Spezifität der polyklonalen Antikörper (pAK) für den nativen Rinderherz-CAT-AAC. Dabei bemerkten sie, daß die Inhibitoren CAT und BKA selbst keine Hapten-Eigenschaften besitzen. Die Antikörper verhalten sich auch gegenüber dem Liganden ADP neutral. Eiermann et al. (1977) stellten fest, daß polyklonale Antikörper gegen Rinderherz-BKA-AAC nicht mit der gleichen Selektivität wie polyklonale Antikörper gegen Rinderherz-CAT-AAC reagieren. Das führt zu dem Schluß, daß konformationsspezifische Antikörper gegen den ADP/ATP-Carrier gebildet werden. Antikörper gegen Rinderherz-CAT-AAC zeigten eine schwache Reaktion mit dem Rindernieren-AAC (Ri-N-AAC) und erkannten *Neurospora crassa*-AAC nicht. Dieser Hinweis auf eine Organspezifität wurde von Kolarov et al. (1978) durch kompetitive Bindungsstudien an Herz-, Nieren- und Leber-AAC bestätigt. Schultheiß et al. erhärteten diese Befunde in ihren Arbeiten (1984a, b, c, 1985a, b). Boulay et al. bemerkten in diesem Zusammenhang bei der Untersuchung der Kreuzreaktivität (1986) eine vergleichbare Reaktion gegen Na-Dodecylsulfat denaturierte Antigene wie Rinderleber-AAC und Rattenherz-AAC mit polyklonalen Antikörpern, die gegen nativem Rinderherz-CAT-AAC bzw. SDS-denaturiertem Rinderherz-AAC gewonnen wurden. SDS-denaturierter Rattenleber-AAC erkennt im wesentlichen nur Rinderherz-CAT-AAC-spezifische polyklonale Antikörper. Sie bestätigten somit die Hypothese einer Organspezifität. Boulay et al. (1986) schließen aber unterschiedliche posttranskriptionale Modifikationen sowie die Existenz von fest gebundenem Cardiolipin (CL), welches Antikörperbindungsstellen abdecken könnte, nicht aus.

1.3. Die Bedeutung des AAC im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen

Arbeiten von Berg (1967, 1969, 1980, 1986) zeigten früh die Existenz und klinische Bedeutung von Antikörpern, die gegen mitochondriale Proteine gerichtet sind. Er ordnete diese damals nach ihrer Spezifität für

folgende Krankheiten zu: M-1 (Syphilis); M-5 (undefinierte Kollagenenerkrankungen); M-7 (einige Formen von Herzerkrankungen); M-3 (drogeninduzierte Störungen); M-6 (Pseudolupus Syndrome); das Krankheitsbild der primären biliären Cirrhosis (PBC) wurde durch Antikörper gegen den M-2, M-8 und M-9 Antigen beschrieben. Diese zeigten auch eine Reaktion im Komplementbindungstest (CFT). Dem gegenüber läßt sich M-6-Antigen nur in den äußeren Membranfraktionen nachweisen. Berg (1986) weist auch bei Antikörpern gegen M-7-Antigen, die durch akute virale Myokarditis gebildet werden, auf eine dominante IgM-Immunantwort hin. Außerdem zeigt er, daß Antikörper gegen M-2-Antigen einen weiteren Antikörper gegen ein tryptisin-insensitives, organspezifisches Antigen (M-9) enthalten. Schultheiß (1984b) konnte mit einigen Patientenserum eine Spezifität der mitochondrialen Antikörper für M-2-Antigen nachweisen. Diese hemmen seiner Meinung nach den Nukleotidtransport und besitzen somit eine Spezifität für das ADP/ATP-Transportprotein. Eine Inhibition des Austausches von ATP gegen ADP in Nieren- und Lebermitochondrien ist hingegen nicht nachweisbar. Dies könnte ein Hinweis für eine Organspezifität der Substrat/Liganden-Bindungsstelle sein.

Einige neuere Arbeiten von Schultheiß (1985) zeigen eine Reaktivität von spezifischen, gegen den Nukleotidcarrier gerichteten Antikörpern mit Myozyten und eine Kreuzreaktivität dieser Antikörper mit einer Untereinheit des Connexons. Dieses kanalbildende Protein kommt in der "gap junction" Region der Zellmembran vor. Er schließt in dieser Arbeit mit der Annahme, daß dieses Protein als Rezeptor für eine "Rezeptor vermittelte" Endozytose der Autoantikörper dienen soll. - Neueste Ergebnisse von Schultheiss (unveröffentlicht) zeigen eine Kreuzreaktivität zwischen dem Calciumkanal und dem Nukleotidcarrier.

Mehrere Autoren (Bottazzo 1986, Kawai 1987, Schultheiß 1985, Tardieu 1984 und Zanetti 1986) haben sich mit den Ursachen für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und deren Folgen auseinandergesetzt. Sie sehen eine Voraussetzung für das Entstehen dieser Erkrankungen in einer genetischen Prädisposition des Patienten. Durch Infektion mit Coxsackie B3 Viren wird dann die Bildung von Autoantikörpern induziert. Die vielen verschiedenen regulatorischen Einflüsse auf die Expression des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex II (MHC II) sind z.Zt. noch Gegenstand der

Forschung (Bottazzo 1986). In einer Hypothese wird in diesem Zusammenhang vorgeschlagen, daß neben dem MHC II, weitere genetische Systeme bei der Entstehung der Autoimmunität beteiligt sein sollen (Sanz et al. 1988). Ein möglicher Weg, diese Meinung mit den bis jetzt bestehenden in Einklang zu bringen, bestände darin, abweichende Ergebnisse durch komplexe regulatorische Einflüsse des Immunsystems zu erklären. Diese umfassen eine Zeitabhängigkeit in der Expression im Laufe der Ontogenese und in der Selektion des T-Zell-Repertoires. Dabei interagieren diese Faktoren alle mit dem Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex und stehen unter Einfluß von Umweltbedingungen. Bei Patienten, die an Autoimmunerkrankungen leiden, wird daher die Expression entsprechender Klone, die ebenfalls bei Gesunden vorhanden, aber regulatorisch gehemmt sind, stimuliert.

Rose et al. (1988), Neu (1987), Evered (1987) unterscheiden in diesem Zusammenhang zwei verschiedene Arten von Antikörpern, die für die Entstehung der Myokarditis verantwortlich sind. Es können zum einen "kreuzreagierende Antikörper gebildet werden, wie sie bei Chagas, dilativer Kardiomyopathie, rheumatischer Karditis und Adriamycin-Kardiotoxizität" (Rose et al. 1986) auftreten, zum anderen kann es aber auch zur Bildung von Antikörpern gegen eine schwere Kette des Myosins kommen (Neu et al. 1987). Durch diese wird das kontraktile System der Muskulatur zunehmend direkt geschädigt.

Maisch et al. (1983) stellten fest, daß Seren von Patienten, die an Myokarditis erkrankt waren, auch mit sarkolemmalen und cytoplasmatischen Herzantigenen reagieren. Er erweitert somit, wie dies beim M-6-Antigen schon angedeutet wurde (Berg 1986), den Kreis der möglichen Autoantigene, wie auch Frazer (1983) und Mendel-Hartwig (1986). Letzterer kann hauptsächlich eine Spezifität seiner Patientenseren für humane mitochondriale Antigene von 70 kD und 50 kD nachweisen. Erst kürzlich konnte dies von Gershwin et al. (1988) bei PBC-spezifischen Patientenseren bestätigt werden. Sie konnten eine immunologisch nachweisbare Reaktivität mit mitochondrialen Antigenen von 37 kD und 52 kD feststellen. Darüberhinaus identifizierten sie mit Hilfe von c-DNS Klonierungsmethoden durch Sequenzierung ein ebenfalls in Frage kommendes Autoantigen von 70 kD Größe als

Lipoamidacetyltransferase, das "Core Protein" des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes. Die zweite Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase mit 50 kD und unbekannter Funktion wird ebenfalls dem M-2 Autoantigen zugeordnet, wie Yeaman et al. (1988) bestätigte. Van de Water et al. (1988) zeigte vor kurzem, daß in der Bindungsstelle, der erwähnten Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase für Liponsäure, das Peptid 81-100 als Epitop, ausschließlich für Autoantikörper gegen die primäre biliäre Cirrhosis, fungiert.

Frazer (1983) weist auch noch auf ältere Arbeiten (Thomas 1980, Berg 1980) hin, in denen die primäre biliäre Cirrhosis als organspezifische Autoimmunerkrankung bzw. deren spezifische Antikörper als sekundär reaktiv bezeichnet werden. Diese sind mit den Cardiolipin-spezifischen Antikörpern der Syphilis verwandt.

Die sehr starke Kreuzreaktion zwischen den Cardiolipin-spezifischen Antikörpern und den gegen Desoxyribonukleinsäure (DNS) gerichteten, (Rauch et al. 1986) zeigt einen Zusammenhang mit einer schon lange bekannten und daher gut untersuchten Autoimmunerkrankung, dem systemischen Lupus Erythematodes, (Eilat 1982). Dabei bilden sich Immunkomplexe von Autoantikörpern gegen einzelsträngige DNS, die das Ultrafiltrationssystem der Niere blockieren.

Maisch (1983) vermutet als Ursache für die Myokarditis eine komplementvermittelte, cytotoxische Reaktion und steht damit im Gegensatz zu Schultheiß, der als Ursache für die Erkrankung einen endozytotischen Transportprozess von funktionsspezifischen Nukleotidcarrier-Autoantikörpern postuliert.

Die außerordentlich klinische Bedeutung dieser Autoimmunerkrankungen zeigt nachdrücklich die Wichtigkeit weiterer Untersuchungen auf diesem Gebiet.

1.4. Wissensstand über die Topologie am AAC

Der Nukleotidcarrier, ein Membranprotein mit einem isoelektrischen Punkt = 10.6, besteht aus einer dreigeteilten Struktur mit insgesamt sechs α -helicalen Abschnitten, deren hydrophobe Teile das Protein asymmetrisch in der inneren Mitochondrienmembran verankern. Da dieses Transportprotein bis jetzt noch nicht kristallisiert werden konnte, ist man momentan auf indirekte Verfahren angewie-

sen, um Informationen über die Topologie an diesem Protein zu erhalten. Eine solche Arbeit, welche die Bestimmung der Position von reaktiven Lysinen auf der zugänglichen Oberfläche des Nukleotidcarriers in verschiedenen Bindungszuständen zum Ziel hatte, (Bogner 1986) gibt Anhaltspunkte über die Verteilung von fünf hydrophilen Bereichen auf der Oberfläche des Translokators. In Abbildung 2 ist die Anordnung der Lysine am ADP/ATP-Carrier dargestellt.

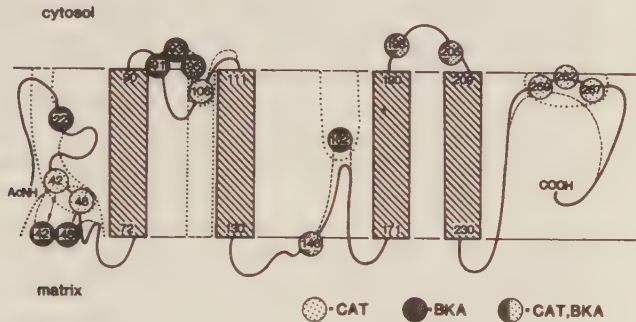


Abb.2 Darstellung der möglichen Faltung des ADP/ATP Carriers in der inneren Mitochondrienmembran. - Das gezeigte Modell basiert auf der Annahme von Membran-überspannenden Abschnitten des AAC und den Ergebnissen der PLP-Modifikationen von Lysinresisten an intakten Mitochondrien und Schallpartikeln. Die Abbildung zeigt reaktive Lysine im Zustand der Bindung von CAT (◐) und markierte Lysine im BKA-gebundenen Zustand (◑). Lysinpositionen, die in beiden Zuständen reagieren, sind zur Hälfte schraffiert. Gestrichelte Linien verbinden Lysine, die nur im m-Zustand markiert werden.

Strukturvorhersagen von Saraste et al. (1982) stellten fest, daß die Abschnitte I (Aminosäure 9-39), III (105-137) und V (205-234) ebenso zueinander homolog sind, wie die Abschnitte II (64-90), IV (170-202) und VI (265-294) der Sequenz des AAC.

Boulay et al. (1986) gelangen im Rahmen von Bindungsstudien mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern an Peptidspaltungsmustern eine grobe Zuordnung der Bindungsregionen am Rinderherz-CAT-AAC und am -SDS-AAC. Sie kamen dabei zu dem Ergebnis, daß beim CAT-AAC die immunologische interessanten Bereiche an den Enden des AAC liegen, während diese beim SDS-AAC bevorzugt im mittleren Teil seiner Sequenz konzentriert sind.

In diesem Zusammenhang konnten erstmals Beyer et al. (1985) nachweisen, daß am nativen Rinderherz-CAT-AAC und am denaturierten -SDS-AAC fest gebundenes Cardiolipin vorkommt. Kürzlich durchgeführte NMR-Messungen (Beyer et al. 1988) kamen zu dem Ergebnis, daß der AAC 6-8 Mol Cardiolipin/Mol AAC bindet. Daran sind wahrscheinlich die Aminosäuren Arginin und Lysin beteiligt.

Komplexierungsversuche von mitochondrialen Proteinen zeigten, daß Cardiopilin an Proteinen von 35 kD und 45 kD nachweisbar ist (Cheneval et al. 1983).

Es zeigte sich, daß eine Reihe von Cysteinen, Argininen und Tryptophanen ebenfalls einen Einfluß auf die Funktion des AAC haben. Der hydrophobe Abschnitt 156-200 dagegen zeigt Nukleotid-Bindungseigenschaften, da sich dieser Bereich der Primärstruktur durch Azidoderivate des ADP und Atraktylats photochemisch markieren ließ (Vignais et al. 1985). Erst kürzlich präzisierten diese Autoren nochmals (Dalbon et al. 1988) die Ergebnisse der photochemischen Markierungsexperimente. Sie stellten dabei fest, daß 2-Azido-[α -P³²]Adenosin-Diphosphat an zwei Bindungsstellen der AAC-Sequenz Phe 153-Met 200 und Try 250 bis Met 281 nachgewiesen werden kann.

Chemische Markierungsversuche des Rinderherz-AAC zeigten, daß sich Cystein 56 gegenüber N-Äthyl-Maleimid reaktiv verhält (Boulay et al. 1984).

1.5. Problemstellung

Da für eine sichere Beantwortung der Fragen nach der Topologie des Nukleotidcarrier mit Hilfe rein immunologischer Verfahren die bis jetzt verwendeten polyklonalen Antikörper nicht mehr ge-

nügten, lag es nahe, die nicht präzipitierenden, monoklonalen Antikörper zu verwenden, um die notwendigen Informationen über charakteristische spezifische und kreuzreagierende Eigenschaften dieses Antigens zu erhalten. Von besonderem Interesse waren dabei folgende Punkte:

1. Die Selektion von funktionellen hemmenden monoklonalen Antikörpern als Hilfsmittel zur Aufklärung von Struktur- und Funktionsbeziehungen am ADP/ATP Translokators und als Nachweis für den nativen Zustand des Proteins während der Bildung der Immunantwort.
2. Identifizierung der Anzahl und Lage von Epitopen auf der Oberfläche des ADP/ATP Carriers mit Hilfe von geeigneten monoklonalen Antikörpern.
3. Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen SDS-denaturiertes, Uncoupling Protein zur Klärung der Frage nach einer immunologisch nachweisbaren Sequenzhomologie zwischen dem Nukleotidcarrier und dem Uncoupling Protein.
4. Die Erforschung der Ursache für die organspezifische Immunreaktion und Untersuchung der Autoimmunität des Nukleotid-carriers mit Hilfe von ausgewählten Patientenseren.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien und Geräte

An Chemikalien wurden verwendet:

Säulenmaterialien

Sephadex^R G-75

Pharmacia

Sepacryl^R S-300

CNBr-akt. Sepharose

PD-10 Entsalzungssäulen

ACA 34

LKB

Radioaktive Substanzen

¹⁴C-ATP

Amersham-Buchler

¹²⁵I

³H-CAT

wurde nach (Babel 1978)
markiert

Immundiagnostika

Ziege- α -Maus IgG/IgM-Pod markiert

Dianova

Ziege- α -Maus IgG/f_c-Pod "

F ' 2 Ziege- α -Maus IgG/Fc-Pod "

F ' 2 Ziege- α -Kaninchen IgG/Fc-Pod markiert

Ziege- α -Mensch IgG/F_c-Pod "

Ratte- α -Maus IgG/(Fab)₂ Pod "

Tago

Ratte- α -Maus IgM Pod "

Sigma

N-hydroxysuccinimid-Biotin

Sigma

Avidin-Peroxidase

Spector

Subklassentest

Calbiochem

Chemikalien

Protein-A, Cholesterin, ODP, DAB,

Sigma

Poly-L-Lysin, ATP, CAT, Chloramin-T,

DTE, β -ME, Tween-20

Thioglycolsäure, H₂O₂, PEG, Methanol

Merck

z. Synth.

Polyethylenglycoll Chargen Nr. 86F8805/ Charge 60901401	Boehringer, Sigma
Nitrozellulosepapier verschiedener Porengröße	Schleicher & Schüll
Immobilon	Millipore
Acrylamis, Bisacrylamid, N,N,N',N' Tetra methylethylendiamin	Serva
Capronsäure, Ionenaustauscher XAD-2, Mischbettionenaustauscher MB-1, Natrium- dodecylsulfat, Dialyseschläuche	Serva
India-Tinte	Pelikan
Aurodye	Janssen
Crotein-C	Croda
flüssige, hochreine Gelatine	Norland
Na-Desoxycholsäure	Fluka
Cardiolipin, Phosphatidylserin, Phosphati- dylinositol	Sigma
AffiGel Protein A-Säule	Biorad ^R
foetales Rinderserum, Medienzusätze, RPMI- Medium	Gibco
verschiedene Freundsche Adjuvantien	Behring
flexible Elisa-Testplatten	Dynatech, Costar
Cardiolipin-Antiserum	Prof. Radunz, Bielefeld
Syphilis-Anti-IgG (VDRL)	Dr. Krebs, ETH Zürich
Neurospora crassa-AAC Antiserum	Prof. Neupert, München

Hydroxylapatit wurde nach der Methode von Tiselius (Bernardi 1971)
selbst hergestellt.

Phospholipid wurde nach der Methode von Wells (1969) hergestellt.

Alle übrigen Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad p.A. bezogen.

Verwendete Geräte

Szintillationszähler (TriCarb 2660)	Packard
Ultraschallsonden	Branson
Sinterglasplatten	Robu
Densitometer Elscript	Hirschmann

Mighty Small II Laufkammer für Elektrophorese	Hoefer
Mighty Small Transphor Transferkammer	Hoefer
Transferkammer f. gr. Gele	Biowerk
Blotgerät für Peptide	Biometra
Fluorometer MPF-44A	Perkin Elmer
Steuergerät f. Immunoblots Zabona	Dirotron

Alle für die Hybridoma-Arbeiten notwendigen Geräte und Einrichtungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Tappert am Institut für Haematologie mitbenutzt.

Zentrifugen

Tischzentrifuge 2200	Eppendorf
UZ-Kontron TGA 65 (Rotor 35, 50, Ti & 42,1)	Kontron
UZ-L7-55 und UZ L5-50	Beckmann
Sorvall RC 2B und 5B (GS-3, SS34)	Beckmann

2.2. Methoden

2.2.1. Analytische Methoden

Die Proteinbestimmungen wurden nach der modifizierten Methode von Lowry unter Zusatz von 1% SDS (Helenius & Simons, 1972), bzw. nach der Biuret-Methode von Bode (1967) durchgeführt. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen erfolgten nach den Methoden von Laemmli (1970) und Schägger (1987). Die IgG-Bestimmungen erfolgten bei 280 nm mit einem Extinktions-Koeffizienten von $13.5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Der Gehalt an Triton wurde nach der Methode von Helenius (1972) bestimmt.

2.2.2. Allgemeine und Präparative Methoden

Rinderherzmitochondrien wurden nach der Methode von Blair (1967) präpariert und mit dem Inhibitor CAT bzw. ^3H -CAT (2 nmole/mg Protein beladen. Das CAT-AAC wurde mit Hilfe von TX-100 nach

Aquila (1978) extrahiert und mit HTS gereinigt. Die Präparation des nativen UCP erfolgte nach Lin (1982). Durch Inkubation mit SDS bei Raumtemperatur und anschließender TCA-Acetonfällung und Gel-chromatographie in 2% SDS, wie bei Aquila et al. (1984) beschrieben, wurden die Proteine denaturiert. Der Hefe-AAC wurde nach Verbesserung einer bereits bekannten Vorschrift nach Knirsch (1988) gereinigt. Um besonders reinen Ra-Leber bzw. K-Leber-AAC und Ri-Herz-AAC für Immunisierungszwecke zu erhalten, wurde das Protein aus gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen eluiert. Der dabei gebundene Farbstoff Coomassie Blau (CBB) wurde durch Chromatographie in 80% Ameisensäure bei Raumtemperatur entfernt (Aquila, 1982).

Der Nukleotid-Carrier aus Rinderherzmitochondrien (BHM) wurde mit Hilfe von TX-100 in einem 'batch'-verfahren nach Kasahara (1977) und Krämer (1982) extrahiert und mittels HTS gereinigt. Das für die Rekonstitution benötigte Phospholipid wurde nach Beyer et al. (1977) hergestellt. Nach dem Einbau in die Liposomen wurde der ADP/ATP Carrier mit Hilfe der Frier-Tau-Methode funktionell aktiv rekonstituiert (Krämer et al. 1977 und 1979). Der Puffer zum Beschallten enthielt neben 25 mM ATP, 10% Cholesterin und 700 mg gereinigtes Phospholipid. Die Proteoliposomen wurden 30 Sekunden lang im Eiswasserbad beschallt und anschließend auf eine Sephadex G-75 Säule gegeben (Pufferzusammensetzung: 45 mM Na_2SO_4 , 10 mM Saccharose und 10 mM 1,4-Piperazindiethansulfonsäure, pH-8,15). Nach Beendigung der Austausch-Reaktion mit einer Mischung von CAT/BKA wurde externes, ^{14}C -markiertes ATP, welches nicht gebunden hatte, durch Ionenaustauschsäulchen (DOWEX 1-X8) entfernt. 100-200 μl der Liposomensuspension wurden auf die Säulen mit 5 x 25 mm Größe aufgetragen und anschließend mit 800 μl 45 mM Na_2SO_4 eluiert. Aliquots von 500 μl des Eluats wurden dann auf ihren Gehalt an internem, radioaktiv markierten Nukleotid vermessen.

Zur Präparation von funktionell aktivem Carrierprotein für die DAN-AMP-Fluoreszenz (Klingenberg, 1986) wurde das Protein nach

dem gleichen Verfahren wie oben beschrieben hergestellt und in Liposomen mit 2% Triton X-100 eingebaut. Bei diesem Testsystem ist eine Dichtigkeit der Proteoliposomen nicht erforderlich. Anschließend wurde mit Hilfe einer mehrmaligen Passage auf einer Amberlite XAD-2 Säule der Tritongehalt auf ein Verhältnis Detergenz : Protein von 3,5 reduziert. Vor der Verwendung des rekonstituierten Proteins erfolgte eine Abtrennung der feinen HTS- und Amberlite-Partikel durch Zentrifugation bei 12000 g/20 min.

2.2.3. Immunisierung, Fusion und Klonierung von Hybridoma-Zellen

30 männliche F_1 -Mäuse (Balb-C x C5BL/6) wurden in einem Alter von 3 Wochen beim Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover bestellt. 100 µg Carboxatraktylat markierter, nativer Nukleotid-carrier, vermischt mit vollständigem Freund'schem Adjuvans in einem Verhältnis 1 : 1, wurde den Tieren in einem Alter von vier Wochen intraperitoneal injiziert. Einen Monat später wurden die Tiere nochmals mit 50 µg nativem Nukleotidcarrier in unvollständigem Freund'schem Adjuvans gespritzt. In einem Zeitabstand von 4 Wochen wiederholte sich dieses Verfahren noch zweimal. Nach einer Pause von 14 Wochen wurden die Mäuse nochmals zweimal intraperitoneal immunisiert. Drei Tage darauf wurden zwei Tiere (26,4) durch Genickbruch getötet, entblutet, die Milz steril entnommen, homogenisiert und Myelomazellen und Milzzellen in einem Verhältnis 1 : 3 fusioniert (Köhler 1975). Als Fusionspartner für die Milzzellen wurde die nicht produzierende Myeloma-Zelllinie X-63 Ag8/653 von Kearney et al. (1979) verwendet. 22 Stunden nach der Fusion wurde das fusionierte Zellmaterial auf 20 Mikrotiterplatten mit je 96 Löchern mit einer Zelldichte von 10^4 /ml vorsichtig verteilt. Drei Tage vor dem Test wurde das Kulturmedium vorsichtig erneuert. Der Test der Kulturüberstände von 300-400 Hybridomaklonen auf eine Reaktion mit Rinderherz-CAT-AAC im ELISA und unabhängig davon, auf Hemmung des m-, c- Überganges nach Zugabe von DAN-AMP mit Hilfe eines Fluoreszenz-Testsystems erfolgte nach zehn Tagen. Um den Umfang der Tests gering zu halten, mußten die monoklonalen Antikörper von 3-4 Löchern vereinigt werden. Bei positivem Resultat

wurden die Klone einzeln ein zweites Mal getestet. Nach Abschluß der Klonierungen wurden die monoklonalen Antikörper der expandierenden Hybridomaklone nochmals auf ihre hemmende Aktivität im Nukleotid-Austausch am rekonstituierten AAC getestet, deren Subklasse bestimmt und anschließend einige ausgewählte Klone in die Bauchhöhle von pristanisierten Mäusen injiziert. 2-4 Wochen später erfolgte dann die Abnahme der Ascites-Flüssigkeit.

Das Schema für die Langzeitimmunisierungen mit SDS-AAC und SDS-UPC, sowie deren Fusionsbedingungen entsprachen den vorhin genannten, nur wurden bei der letzten Fusion mit SDS-UCP als stimulierendem Antigen, zwei andere Chargen Polyethylenglycoll (Sigma, Boehringer) mit höherer Fusionsausbeute verwendet.

2.2.4. Gewinnung und Reinigung von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen

Um spezifische polyklonale Antikörper gegen verschiedene Carrierantigene zu erhalten, wurden drei Monate alte Kaninchen zuerst subcutan mit Hilfe von vollständigem Freund'schem Adjuvans Injektionen in die Hinterpfoten gegeben. Sieben Tage nach der dritten Injektion konnten erstmals etwa 50 ml Blut, welches spezifische polyklonale Antikörper enthielt, aus der Ohrarterie entnommen werden. Anschließend stand das Blut zur Gerinnung etwa zwei Stunden bei Raumtemperatur und wurde dann bei 10000 g 20 Minuten lang zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde in verschiedene große Aliquots verteilt und bei -70°C eingefroren.

Zur Präparation von IgG wurde das Serum bei 120000 g in der Ultrazentrifuge von störenden Fibrinresten und Aggregaten befreit, filtriert und in 0,1 M Phosphatpuffer, pH = 8,0, mit Hilfe einer großen Protein A Säule (Leihgabe von Prof. Dr. Rieber, Institut für Immunologie, München) gereinigt. Nach der Elution des spezifisch gebundenen IgG mit Hilfe eines 0,1 M Citratpuffers, pH 3,0, konnte das spezifische IgG durch Vorlage eines 1M Tris Puffers, pH 9,0, sofort neutralisiert und anschließend das konzentrierte IgG gegen PBS pH = 7,2 dialysiert werden. Um eventuell aggregiertes Immunglobulin

und niedermolekulare Verunreinigungen zu entfernen, erfolgte eine abschließende Reinigung der Präparation mit Hilfe einer großen Sephacryl S-200 Säule und eine Bestimmung der IgG-Aktivität mit Hilfe eines spezifischen Elisa.

2.2.5 Quantitativer RIA-Immunoblot

Bis jetzt verwendete immunologische Nachweisverfahren konnten durch Verunreinigungen und Aggregationsprodukte der verwendeten Antigene gestört werden. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein quantitativer Immunoblot entwickelt, der diese Beeinträchtigungen korrigieren kann. Er erlaubt mit Hilfe eines gefärbten SDS-Polyacrylamidgels und nach radioimmunologischer Dekorierung mit geringer Reinheit eine Aussage über die Organspezifität verschiedener SDS-denaturierter Nukleotidcarrier zu machen.

Um vergleichbare Bedingungen für den Transfer zu bekommen, wurden jeweils gleichzeitig vier Laemmli-Gradientengele (10-15%) mit einer Dicke von 1,5 mm mit Hilfe eines geeigneten Verteilers gegossen. Anschließend erfolgte die Beladung der Gele mit je 4 Eichstandards (3-12 µg) der verschiedenen Proteine. Nach dem Lauf, bei 90 V über Nacht im Kühlraum, wurde je ein Gel mit Coomassie Blau gefärbt. Das zweite Gel wurde mit Hilfe von zwei Sinterglasplatten (Größe 0) in einer Tauchkammer (Biowerk) 22 Minuten bei 800 mA und 9,6 V/cm und anschließend 90 Minuten mit 250 mA und 3 V/cm auf Nitrozellulosepapier mit hoher Bindungskapazität transferiert. Nylon-Papiere mit sehr großer Bindungskapazität (480 µg/cm²) erwiesen sich für Membranproteine als ungeeignet. Für den elektrischen Transfer fand dabei der Tris/Glycin Puffer nach Towbin (1984) unter Zusatz von 0,1% SDS Verwendung. Um einen guten, quantitativen Transfer zu erreichen, mußte darauf geachtet werden, daß das empfindliche Protein im Gel vor dem Blot nicht unnötig in den methanolhaltigen Transferpuffer gelegt wird. Es zeigte sich auch, wie in Abbildung 3 dargestellt, daß erhöhte Tritonkonzentrationen der Proben für einen geringen Nachweis des

Nukleotidcarriers in der zweiten Nitrozellulose-Papierschicht und damit für einen scharfen Transfer notwendig sind.

Der Rinderherz ADP/ATP Carrier, der den Inhibitor Carboxyatraktylat gebunden hatte, wurde entsprechend der geringen Reinheit und Färbungsintensität der übrigen Transportproteine 1 : 4 verdünnt. Somit war eine bessere Vergleichbarkeit und eine genauere Auswertung der Ergebnisse möglich. Bei einem optimalen Transfer, bei dem das Protein in möglichst kurzer Zeit vollständig aus dem Gel auf die erste Nitrozellulosepapierschicht übertragen wird, stören die Lochgitter einen gleichmäßigen Stromfluß durch das Gel. Deshalb waren Sinterglasplatten zur Fixierung der Einheit aus Gel, Nitrozellulosepapier und den schützenden Whatman-Papieren erforderlich. Nach dem Transfer und der Dekorierung mit polyklonalen Antikörpern und ¹²⁵I-Protein A wurden die unterschiedlich gefärbten Banden mit Hilfe der Autoradiographie und einer nochmaligen Färbung des Nitrozellulosepapier mittels γ -Zähler ausgewertet. Die Intensität der Blaufärbungen wurde mit Hilfe eines geeigneten Densitometers (Hirschmann Elscript 400) bei 589 nm gemessen und quantifiziert. Das Verfahren zur Quantifizierung der Färbung nach Everitt et al. (1984) durch Elution des gebundenen Coomassie Brilliantblau Farbstoffes in Essigsäure/50% Methanol und anschließende photometrische Auswertung bei 605 nm war bei stark gefärbtem Proteinen genauer, erwies sich aber bei schwach angefärbten Banden als ungeeignet. Die Meßwerte beider Verfahren wurden am Ende gegeneinander aufgetragen. Die Steigung der daraus resultierenden Graphen ergeben ein Maß für die Organspezifität der verschiedenen Nukleotidcarrier gegenüber dem Rinderherz-AAC.

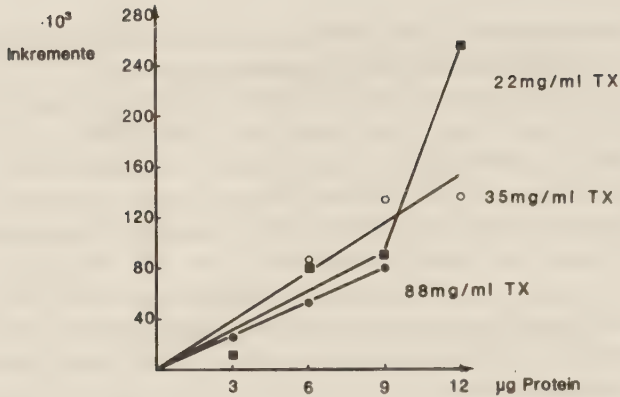


Abb. 3 Optimierung der Bedingungen für die Bindung von Rinderherz-Nukleotidcarrier auf dem Nitrozellulosepapier im quantitativen Immunoblot. - Abhängigkeit der Absorption von CAT gebundenem Nukleotidcarrier vom Zusatz von Triton X-100. Die Bindung dieses Antigens an der 2. Nitrozellulosepapierschicht wurde nach Färbung mit India-Tinte densitometrisch mit Hilfe von Paraffinöl im transparenten Zustand vermessen. Tritongehalt (■-■) 22 mg/ml; (○-○) 35 mg/ml; (●-●) 88 mg/ml; Ordinate: Inkmente, verrechnete relative Absorptionseinheiten der gefärbten Proteinbande - Abszisse: µg transferiertes Protein

2.2.6. Immunoblot und Elisa-Testsysteme

Beim normalen Immunoblot fanden die kleinen Laemmli-gele (8 x 10 cm) nach Tobwin (1975) bei 180 mA und 8 V/cm ca. 160' in einer kleinen Tauchkammer von Hoefer Verwendung.

Die Inkubations- und Waschbedingungen für die Dekorierung mit Kaninchen-pAk richteten sich nach folgendem Schema :

- 1 x waschen mit PBS/0,05% Tween
- blocken d. Unspezifität mit 2%
- hochreiner Gelatine für 1 h in PBS/0,05% Tween

3 x 10' waschen mit PBS/0,05% Tween

1. Ak (Verd. 1 : 200 - 1 : 5000) verd. in 20% FCS
in PBS/0,05% Tween für 1 Stunde
8-10 x 10' waschen in PBS/0,05% Tween

F₂- Ziege- α -Kaninchen Pod wird 1 : 5000 verd.
in 20% FCS/PBS/0,05% Tween
7-10 x 5' waschen in PBS/0,05% Tween

Substratlösung nach Angel und de Blas (1983)
wurde zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach 5-10'
durch Waschen mit Aqua bidest gestoppt.

Die Titer der Kaninchen- und Mäuseseren wurden mit Hilfe eines Elisa bestimmt. Dieses Verfahren ist nach dem gleichen indirekten Prinzip wie oben beschrieben aufgebaut, nur wird an Stelle von Nitrozellulose-Papier flexibles Plattenmaterial oder mit Poly-L-Lysin vorbeschichtete PVC Elisaplatten verwendet. Im Unterschied zum oben gezeigten Schema werden die Platten nach jeder Inkubation nur 3 x mit PBS/0,05% Tween gewaschen. Als Substratlösung wurde Ortho-Phenylendiamin (2 mg/ml) gelöst in Tris/Citratpuffer, pH 5.0 und 2 μ l H₂O₂/10 ml Substratlösung verwendet. Die Beschichtung der Platten erfolgte mit 0,9 μ g/ml nativem Protein im Eisbad bzw. mit gleicher Menge denaturiertem Protein bei Raumtemperatur. Die Vorbeschichtung mit poly-L-Lysin wurde ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Dazu inkubierte die Lösung von 2,5 μ g/ml in PBS für 20-25 Minuten. Durch diese Behandlung wurde die Elisa-Testplatte elektrostatisch positiv aufgeladen um das Antigen, welches von einer Natriumdodecylsulfatmicelle umgeben war, besser an die Testplatte zu binden. Danach wurde nicht gebundenes poly-L-Lysin abgesaugt und die Platte nochmals mit PBS gewaschen. Beide Proteine standen anschließend über Nacht im Kühlraum, bevor sie für einen Test verwendet wurden. Die Puffer für die Beschichtung mit nativem Protein hatten folgende Zusammensetzung: 100mM Na₂SO₄, 10 mM 1,4-Piperazindiethansulfonsäure, 0,05 mM EDTA, 0,05% Natriumazid, pH 7.2. Das Verhältnis Detergenz : Protein war 10. SDS-Protein wurde in Natrium-bikarbonatpuffer,

pH = 9,2 + 100 μ M DTE unter Zusatz von 0,005% SDS gelöst und in die Mikrotiterplatten pipettiert.

Die Beschichtung mit 7,5 μ g/ml Cardiolipin erfolgte in Natriumbicarbonatpuffer + 1 mg/ml Natrium-desoxycholat bei 4° C im Eisbad. Das Lipid wurde vorher etwa 10 Minuten bei 20% Leistung mit einer Ultraschallsonde dispergiert. Nach der Beschichtung wurde die Platte einmal mit 0,1% lipidfreiem Rinderserumalbumin in PBS/0,007% Tween 20 gewaschen und anschließend mit 1% lipidfreiem Albumin (BSA) in PBS/0,007% Tween behandelt, um die unspezifische Bindung der Testplatte zu reduzieren. Nach nochmaligem Waschen wurde der erste Antikörper in einem Inkubationspuffer, der aus einprozentigem, lipidfreiem BSA/0,007% Tween bestand, für eine Stunde belassen, dreimal gewaschen und anschließend mit Peroxidasekonjugat inkubiert. Abschließend wurde die Platte nochmals drei- bis viermal gewaschen, mit Substratlösung versetzt und die entstehende Gelbfärbung der Lösung nach weiteren 20 Minuten bei 455 nm gemessen (Reggiardo 1980; Brockhaus 1985 und F. Jay, persönliche Mitteilung).

Der Subklassentest wurde nach einem von Calbiochem gelieferten Test durchgeführt.

Beim Blot von Cyanbromid-Peptiden wurde der Puffer nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984) verwendet. Durch Verwendung eines Nitrozellulosepapiers mit 0,025 μ m Porengröße (Kasamatsu 1983) konnten die unterschiedlich kleinen Peptide gleichmäßiger vom Trägerpapier gebunden werden. Dieser Arbeitsschritt dauerte acht Minuten. Die Peptide wurden dabei mit 1600 mA und bei 15V/cm unter Kühlung bei etwa 8° C schonend und schnell auf das Nitrozellulosepapier übertragen und anschließend mit Hilfe des sehr empfindlichen und für Peptide besonders geeigneten Auro-dye^R Färbungsverfahrens nachgewiesen (Daneels 1986). Als Nachweis für Protein diente India-Tinte, die 1 : 1000 verdünnt in PBS/0,3% Tween 20 verwendet wurde.

Zur Selektion geeigneter Hybridomaklone, welche an denaturiertem Antigen binden, wurde zusätzlich folgendes Testsystem entwickelt: zwei mg ausgefälltes, mit eiskaltem Aceton gewaschenes und

lyophilisiertes Protein wird bei Raumtemperatur in 50 ml 80% Ameisensäure gelöst und anschließend im Eisbad gekühlt. Das Protein wird durch eine Vorlage von 100 µl Wasser 1 : 100 verdünnt und mit einer Konzentration von 4 µg/ml in einer Elisa-Testplatte verteilt und nach anschließendem kurzen Schütteln eingefroren und lyophilisiert. Vor Gebrauch wurden die Löcher der Testplatte mit 100 µl Natrium-bikarbonatpuffer, pH = 9.6, gefüllt. Nach einmaligem Waschen mit PBS/0.05% Tween 20 am nächsten Morgen werden die Platten mit 0.5% Crotein-C geblockt, eine Stunde später bzw. über Nacht mit dem monoklonalen Antikörper haltigem Kulturüberstand bzw. Ascites inkubiert. Danach wurden die Platten wieder dreimal mit PBS/0.05% gewaschen und mit dem entsprechenden Peroxidasekonjugat etwa eine Stunde lang inkubiert. Nach nochmaligem Waschen konnten die Löcher mit Substratlösung gefüllt und die sich entwickelnde Gelbfärbung nach weiteren 20 Minuten gemessen werden.

Als zweites Testssystem wurde in SDS gelöster Carrier, wie bereits beschrieben, verwendet. Die Block-, Inkubations- und Waschbedingungen für dieses Testsystem entsprechen den bereits beschriebenen, nur wurden die Testplatten mit dem gebundenen monoklonalen Antikörpern und den Peroxidase-markierten Antikörpern je dreimal mit PBS/0.05% Tween gewaschen.

Beim kompetitiven Cardiolipin-spezifischen Elisa erfolgte die Zugabe einer Mischung von beschallten und titriertem Antigen zu 10 µl verdünntem Antikörper. Diese wurden 1h lang inkubiert und anschließend auf eine bereits vorbereitete Testplatte übertragen, wo sie 2.5-3 Stunden belassen wurden. Nach dreimaligem, vorsichtigem Waschen erfolgte die Zugabe von Peroxidasekonjugat, das in einprozentigem, lipidfreiem BSA + 0.007% Tween gelöst worden war. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation wurden die Platten vorsichtig geschüttelt, besonders sorgsam gewaschen, mit Substratlösung inkubiert und im Elisaphotometer gemessen.

Wegen des Glutaminsäuregehaltes des kreuzreagierenden, tryptischen Peptids erfolgte eine elektrostatische Aufladung der Testplatte mit poly-L-Lysin, wie bereits beschrieben. Das Peptid wurde anschließend mit einer Konzentration von 5 µg/ml auf die flexible

Testplatte gegeben (Dynatech), welche eine große Bindungskapazität besitzt. Wegen der für die monoklonalen Antikörper schwierigen Bindungsverhältnisse verblieben diese über das Wochenende auf der Testplatte. Der übrige Test zeigte den gleichen Verlauf wie beim SDS denaturierten Nukleotidcarrier.

Als Testsystem für IgM/IgG "Switchvarianten" wurden zwei sehr empfindliche IgG- und IgM- spezifische Elisass verwendet. Beim IgG-spezifischen Elisa wurde Ratte- α -Maus IgG/f_C mit einer Konzentration von 3 μ g/ml auf die Platten gegeben und mit Hilfe eines Ratte- α -Maus IgG(Fab)₂ (Verd. 1 : 8000) Peroxidasekonjugates die Bindung spezifischer mAk getestet. Das gleichzeitig verwendete IgM-Testsystem sollte die verringerte Produktion von IgM-mAk nachweisen. Dazu wurden die Testplatten mit Ziege- α -Maus IgM/ μ mit 3 μ g/ml beschichtet und mit Ziege- α -Maus IgM/ μ spezifischem Peroxidasekonjugat nachgewiesen (Verd. 1 : 1000).

Immunoblots mit monoklonalen Antikörpern gegen die Säurespaltstücke A1 und A2 des AAC, sowie gegen UCP und UCP-haltige Tritonextrakte aus Mitochondrien unterscheiden sich von den übrigen darin, daß das Protein durch Zusatz von 0,1 mM Thioglycolsäure zum Lauf-, Transfer- und zu allen Inkubations- und Waschpuffern unter reduzierenden Bedingungen gehandhabt wurde. Unspezifische Bindung am Antigen wurde durch Verwendung von BSA als Kontrollantigen im Immunoblot geprüft. Durch Einsatz von Präimmunseren, Isotypkontrollen und FCS-haltigen Inkubationspuffern wurde die Unspezifität des ersten Antikörpers und des Peroxidasekonjugates geprüft. Beim kompetitiven Immunoblot wurden die jeweiligen Antigene durch Vorinkubation mit einem verdünnten monoklonalen Antikörper für eine Stunde und anschließend 2,5 - 3 Stunden auf dem Nitrozellulosepapier belassen, bevor das nicht gebundene Immunglobulin durch Waschen entfernt wurde. Bei den lyophilisierten Patientenserum wurden durch die Lyophilisierung aggregierte Antikörper erzeugt, die durch Ultrazentrifugation weitgehend entfernt werden konnten. Um die dadurch entstehenden Unspezifitäten der Ak-Bindung zu reduzieren, verwendeten wir einen anderen Puffer von Dr. Gürtler (Pettenkofer Inst.) etwas modifiziert (Zusammensetzung: 0,1% Ficoll 70, 0,1% Polyvinylpyrrolidon, 20 mM Tris, 10% Glyce-

rin, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20 und 2% hochreine Gelatine). Die Patientenserum wurden 1 : 2500 verdünnt, das Peroxidasekonjugat wurde 1 : 5000 verdünnt eingesetzt (Ziege- α -Mensch IgG/f_C).

Beim kompetitiven Epitopbindungstest wurde die Platte mit 1% biotinfreiem BSA 1 h lang gewaschen. Der biotinmarkierte monoklonale Antikörper wurde mit einer konstanten Verdünnung von 1 : 80 in einem Volumen von 10 μ l zu 100 μ l titriertem Kulturüberbestand gegeben und 1 h vorinkubiert. Anschließend wurde diese Lösung auf die bereits vorbereitete Testplatte übertragen und 2,5 - 3 h belassen. Nach vorsichtigem, dreimaligem Waschen mit PBS/0,5% Tween wurde Avidin-Pod, welches im Verhältnis 1 : 5000 in 1% biotinfreiem BSA verdünnt worden war, 30' lang vorsichtig geschüttelt, 3 x mit PBS/0,05% Tween gewaschen, mit Substrat versetzt und die entstehende Gelbfärbung mit Hilfe eines Elisaphotometers bei 620 nm (Referenzwellenlänge) gegen 455 nm (Meßwellenlänge) gemessen. Alle Lösungen wurden vorher filtriert, um die Unspezifität zu vermindern.

Die Kopplung des N-hydroxy-Succinimid-Biotin an das monoklonale IgG₁ erfolgte bei einem Verhältnis Biotin : IgG = 150 : 1 in einem Na-bikarbonatpuffer, pH 9,2, mit Zusatz von 0,9% NaCl. Dazu wurde das Biotin in Dimethylformamid gelöst, bei Raumtemperatur 1 h geschüttelt, abzentrifugiert und nach der Kopplung durch Dialyse gegen Natrium-bikarbonatpuffer über Nacht von nicht gebundenem Biotin befreit.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der polyklonalen Antikörper gegen den Nukleotidcarrier

Der Abschnitt 3.1. beschreibt Experimente, welche als Grundlage für die weiteren immunologischen Arbeiten dienen. Dazu gehören die im Abschnitt 3.1.1. durchgeführten Versuche zur Organspezifität der ADP/ATP Carrier (AAC) aus Rinderherz, Rinderniere und Kalbsleber, welche mit Hilfe des quantitativen Immunoblots bestimmt wurde.

Daran schließt sich in 3.1.2. eine Bestimmung der Kreuzreaktivität des AAC zu den homologen Carriern an. Die Kreuzreaktivität wurde durch Immunopräzipitationsversuche im ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay) näher untersucht. Kapitel 3.1.3. befasst sich mit dem Einfluß des Cardiolipins auf die Kreuzreaktivität des nativen Rinderherz-ADP/ATP-Carriers, in der durch den Inhibitor Carboxyatraktylat stabilisierten Konformation (CAT-AAC). Im Kapitel 3.1.4. wird die Spezifität vieler ausgewählter Antikörper mit den Carrier-Antigenen im Immunoblot eingehender charakterisiert.

3.1.1. Untersuchungen zur Organspezifität mit Hilfe des quantitativen RIA-Immunoblots

In dieser Arbeit sollte die bereits bekannte Organspezifität mit Hilfe einer neuen immunologischen Methode eingehender analysiert werden. Der dazu entwickelte quantitative RIA-Immunoblot liefert mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen unter denaturierenden Bedingungen Ergebnisse, die frei von störenden Artefakten wie Verunreinigungen und Abbauprodukten der Testantigene, Aussagen zur Größe der Organspezifität erlauben. Nitrozellulosepapier eignet sich als Trägermaterial besser für eine Detektion der AAC-Antigene. Dabei wird der Nachweis der Epitope auf der Oberfläche des Proteins nicht beeinträchtigt. Die dabei verwendeten, denaturierenden Bedingungen sollten dabei die Beteiligung von konformationsabhängigen Epitopen an der Organspezifität weitgehend ausschließen. Das mitgeführte, gefärbte Kontrollgel diente dazu, den radioimmunologisch dekorierten AAC in das richtige Verhältnis zu den im Gel ebenfalls nachweisbaren Banden der Aggregate, Verunreinigungen und Abbauprodukte zu setzen. Durch Verrechnung der dadurch ebenfalls veränderten Blaufärbung der Nukleotidcarrierbande, mit der entsprechenden Eichkurve der immunologischen Reaktion, werden diese Einflüsse automatisch korrigiert. Der quantitative Transfer des Antigens, der durch die maximale Bindungskapazität reinen Nitrozellulosepapiers von $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ begrenzt wird, war notwendig, um den Fehler dieser Methode auf 5% zu beschränken. Die Quantifizierung der Blaufärbung durch Densitometrie spielt bei den Fehlern in der Detektion eine größere Rolle, als die relativ genaue Markierungsmethode mit Hilfe von ^{125}I -Protein A.

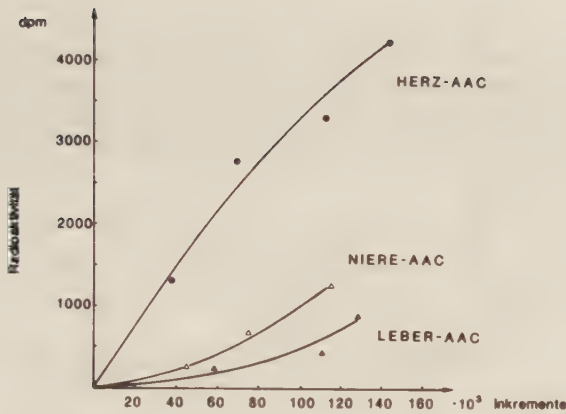


Abb. 4 Quantitativer RIA-Immunoblot.-Die Abbildung zeigt die Organspezifität verschiedener tierischer ADP/ATP Carrier nach Immunopräzipitation mit polyklonalen Antikörpern gegen nativen Rinderherz-Nukleotidcarrier. Die immunologische Reaktion von 3 μ g, 6 μ g, 9 μ g und 12 μ g transferiertem Antigen und die entsprechenden relativen Absorptionseinheiten der gefärbten Proteinbanden wurden jeweils gegeneinander aufgetragen.

(●-●) Rinderherz-AAC; (Δ - Δ) Nieren-AAC; ($\blacktriangle$ - $\blacktriangle$) Leber-AAC. Ordinate: Immunopräzipitation der Antigene nach Zusatz von 125 I-Protein A (dpm).

Abszisse: Integrierte, relative Absorptionseinheiten des gefärbten Proteins (Inkrement), die durch densitometrische Auswertung und Umrechnung gewonnen wurden. Diese sind der absoluten Proteinkonzentration proportional.

Verschiedene polyklonale Antikörper mit Rinderherz-AAC-Spezifität zeigen eine Reaktion mit den Nukleotidcarriern aus Rinderherz, Rinderniere und Kalbsleber. Die Steigung der Graphen in den Abbildung 4-6 wird als Maß für die Kreuzreaktivität der verschiedenen tierischen ADP/ATP-Carriern genommen. In Abbildung 4

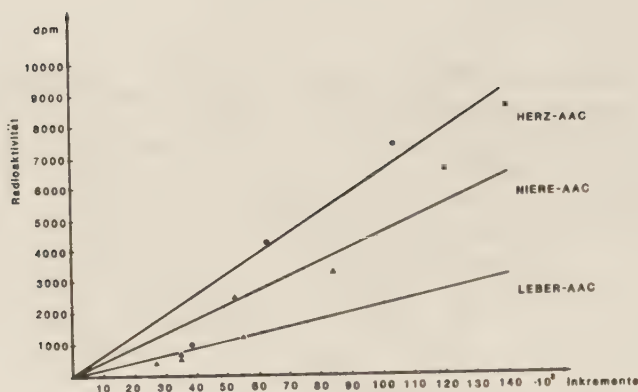


Abb. 5 Quantitativer Immunoblot.— Die Abbildung zeigt die Organspezifität verschiedener tierischer ADP/ATP Carrier nach Immunopräzipitation mit polyklonalen Antikörpern gegen den Rinderherz-CAT-AAC nach Behandlung mit Äther. In der obigen Abbildung sind die Ergebnisse der immunologischen Reaktion und der Proteinfärbungen, welche zu Korrekturzwecken verrechnet wurden, dargestellt. Die immunologische Reaktion von 3µg, 6µg, 9µg und 12µg transferiertem Antigen und die entsprechenden relativen Absorptionseinheiten der gefärbten Proteinbanden wurden jeweils gegeneinander aufgetragen.
(●-●) CAT-AAC; (Δ-Δ) Nieren-AAC; (▲-▲) Leber-AAC.
Ordinate: Immunopräzipitation der Antigene nach Zusatz von ¹²⁵I-Protein A (dpm).

Abszisse: Integrierte, relative Absorptionseinheiten des gefärbten Proteins (Inkremente), die durch densitometrische Auswertung und Umrechnung gewonnen wurden. Diese sind der absoluten Proteinkonzentration proportional.

kreuzreagiert Leber-AAC am schwächsten mit 15% der Reaktion von Herz-AAC. Nieren-AAC wird durch denselben pAk, der gegen nativen Rinderherz-CAT-AAC gerichtet ist, mit 25% der Immunreaktion von Rinderherz-AAC erkannt. In Abbildung 5 wurde im Gegensatz zu Abbildung 4 ein Antikörper verwendet, der gegen Rinderherz-CAT-AAC nach Behandlung des Antigens mit Äther gerichtet ist. Die Immunreaktion von Leber-AAC erhöhte sich dabei nur geringfügig auf 20%. Nieren-AAC kreuzreagiert hingegen mit 70% der Immunreaktion von Rinderherz-AAC. Abbildung 6 verdeutlicht, daß spezifische Antikörper, die gegen Rinderherz-SDS-AAC gerichtet sind, ebenfalls eine Organspezifität für den Rinderherz-AAC zeigen. Unterschiede in der Reaktivität zwischen dem Nieren-AAC und dem Leber-AAC verschwinden dagegen. Man kommt daher zu dem Schluß, daß dieser Antikörper wegen der Behandlung des Antigens vor der Immunisierung eine übereinstim-

mende Kreuzreaktivität von 35% und somit keine Spezifitätsunterschiede zwischen Leber- und Nieren-AAC erkennen kann. Wie im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden wird (Kap. 3. 2. II), könnte die Immunogenität des fest gebundenen Cardiolipins dieses Ergebnis erklären.

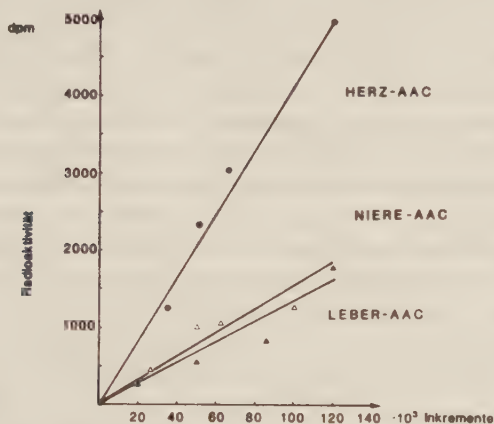


Abb. 6 Quantitativer Immunoblot.— Die Abbildung zeigt die Organspezifität verschiedener tierischer Nukleotidcarrier nach Immunopräzipitation mit polyklonalen Antikörpern gegen den Nukleotidcarrier nach Fällung mit TCA/Aceton und Chromatographie in 2% SDS. Die immunologische Reaktion von 3 μ g, 6 μ g, 9 μ g und 12 μ g transferiertem Antigen und die entsprechenden relativen Absorptionseinheiten der gefärbten Proteinbanden wurden jeweils gegeneinander aufgetragen. (●-●) Rinderherz-AAC; (Δ - Δ) Nieren-AAC; ($\blacktriangle$ - $\blacktriangle$) Leber-AAC. Ordinate: Immunopräzipitation der Antigene nach Zusatz von 125 I-Protein A (dpm).

Abszisse: Integrierte, relative Absorptionseinheiten des gefärbten Proteins (Inkrement), die durch densitometrische Auswertung und Umrechnung gewonnen wurden. Diese sind der absoluten Proteinkonzentration proportional.

3.1.2. Charakterisierung der homologen Antigene AAC, UCP und PIC sowie ATPase im ELISA mit Hilfe von spezifischen Antikörpern

Neben den Untersuchungen zur Organspezifität der AAC-Antigene sollten weitergehende Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der homologen Antigene, i.e. Uncouplin Protein und Rinderherz-Phosphatcarrier durchgeführt werden.

Sowohl SDS-Uncoupling Protein als auch SDS-Rinderherz Phosphatcarrier zeigen keine deutliche immunologische Reaktion mit Rinderherz-SDS-AAC spezifischen Antikörpern. Eine Kreuzreaktivität der polyklonalen Antikörper gegen SDS-UCP mit *Neurospora-crassa* SDS-AAC und Rinderherz-SDS-Phosphatcarrier als Antigen konnte hingegen in ELISA nachgewiesen werden. Die polyklonalen Antikörper gegen SDS-Rinderherz-PiC reagierten ebenfalls mit *Neurospora-crassa*-AAC und mit denaturiertem Uncoupling Protein. Die Antikörper gegen SDS-UCP reagierten verhältnismäßig schwach mit einem Endtiter von 1 : 16000 mit dem Rinderherz-SDS-PiC. Sie zeigten eine vergleichbare Affinität mit dem -Phosphatcarrier ebenso wie die SDS-PiC spezifischen Antikörper. Darin unterscheiden sich diese Ergebnisse der Titrationen von denaturiertem Uncoupling Protein mit Antikörpern gegen SDS-UCP und PiC. Die SDS-UCP spezifischen Antikörper reagieren mit denaturiertem Uncoupling Protein mit einem Titer von 1 : 800000. Die Antikörper, welche gegen SDS-denaturierten Rinderherz-Phosphatcarrier gerichtet sind, erkannten denaturiertes UCP mit einem Titer von 1 : 20000. Diese Antikörper weichen somit in ihrer Affinität für SDS-denaturiertes Uncoupling Protein um 5 Titerstufen ab. Die SDS-UCP-Antikörper reagieren unter den ELISA-Bedingungen hauptsächlich hochaffin mit dem denaturiertem Uncoupling Protein. Wie die Ergebnisse die wir mit Hilfe von mAk erhielten, zeigen werden, wird durch die Bildung von Disulfidbindungen am UCP das kreuzreagierende Epitop für Antikörper unzugänglich und ist daher kaum nachweisbar.

3.1.3. Titration des gereinigten IgG gegen das Syphilis (VDRL-) Antigen und des Cardiolipin-spezifischen Antikörpers mit nativem CAT-AAC

Wie bereits anfangs erwähnt, war es Gegenstand dieser Arbeit auch anderen Erklärungen für die Organspezifität der Rinderherz-AAC nachzugehen. Eine dieser Möglichkeiten war ein eventueller Einfluß von Cardiolipin auf die Kreuzreaktivität des AAC, wie dies von Boulay et al. (1986) angedeutet wurde. Wir verwendeten für diese Titrationsversuche anfangs polyklonale Antikörper gegen das Syphilis-Antigen, später wurden noch Antikörper gegen Cardiolipin zusätzlich eingesetzt. Der Grund dafür liegt darin, daß die Spezifität der Syphilis-Antikörper geringer ist, da diese auch mit Phosphatidylcholin-spezifischen Antikörpern verunreinigt sind. Es erschien umso wahrscheinlicher, daß Cardiolipin als Autoantigen eine Rolle spielen könnte, da Beyer et al. (1985) bereits die Existenz von fest gebundenen Cardiolipin am Rinderherz-AAC nachgewiesen hatten. Dabei blieb aber bis jetzt die Frage offen, ob dieses als kreuzreagierendes Antigen eine wichtige Rolle bei der Organspezifität spielen könnte. Bis dahin ging man davon aus, daß ausschließlich Teile der Sequenz dieses Membranproteins dafür verantwortlich sind.

Als Ergebnis der Titrationsversuche, die in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt sind, stellt man fest, daß beide Antikörper, deutlich mit Rinderherz-CAT-AAC reagieren. Sie zeigen dabei einen Titer von ca. $1 : 10^4$ (Syphilis-Antikörper) bzw. $1 : 10^5$ (Cardiolipin-Antikörper). Der polyklonale Antikörper gegen Rinderherz-CAT-AAC reagiert sogar noch etwas schwächer als der Syphilis-Antikörper wie Abbildung 7 deutlich zeigt. Die Affinität des Cardiolipin-spezifischen Antikörpers für Rinderherz-CAT-AAC liegt bei einem Titer von $1 : 10^5$ sogar noch eine Größenordnung höher als der Titer der Syphilis-Antikörper. Sowohl SDS-UCP als auch SDS-PiC reagieren gut mit Cardiolipin-spezifischen Antikörpern mit einem Titer von $1 : 60000$ (SDS-UCP) bzw. $1 : 10000$ (SDS-Rinderherz-PiC) und vergleichbarer Absorption. (näheres siehe Anhang Pos. 6, 7). - Dieses Ergebnis zeigt, daß Cardiolipin ebenfalls als kreuzreagierendes Antigen am Rinderherz-CAT-AAC und homologen Carriern immunologisch nachweisbar ist.

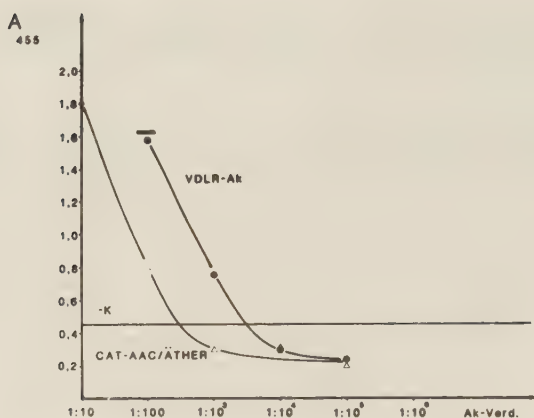


Abb. 7 Cardiolipin als Autoantigen am nativen CAT-AAC. - Titrationsversuche von Antikörpern gegen das Syphilis (VDRL-) Antigen und gegen CAT-AAC, nach Abreicherung des gebundenen Triton mit Äther, zur Ermittlung ihrer Reaktion mit nativem Rinderherz-CAT-AAC. Die Testplatte wurde mit 0.9 $\mu\text{g/ml}$ CAT-AAC beschichtet. Ordinate: Absorption des ELISA-Substrates bei 455 nm (Meßwellenlänge). Abszisse: Verdünnung der polyklonalen Antikörper.

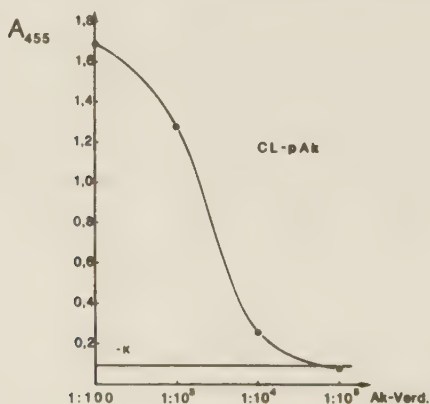
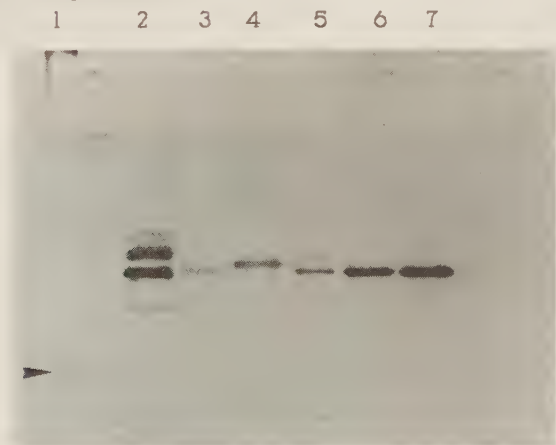


Abb. 8 Cardiolipin als kreuzreagierendes Antigen am CAT-AAC. - Titration des Cardiolipin-spezifischen polyklonalen Antikörpers der Charge 1 auf nativem Rinderherz-CAT-AAC, der durch den Inhibitor vor dem Abbau durch Proteasen geschützt war. Die Testplatte war mit 0.9 $\mu\text{g/ml}$ CAT-AAC beschichtet. -K: Höchste Absorption eines präim-munen Kontrollserums.

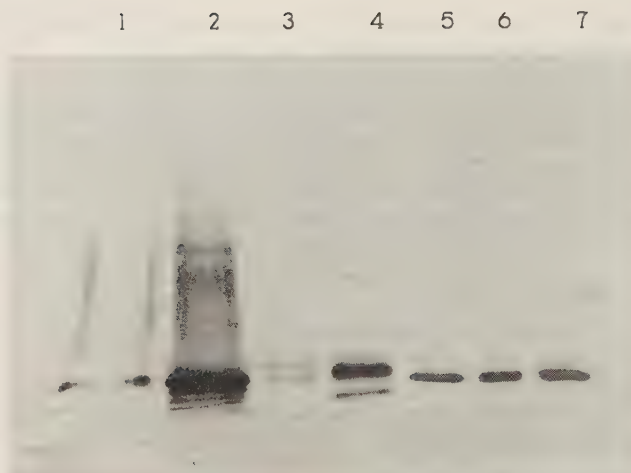
3.1.4. Bestimmung der Spezifität von verschiedenen Antikörpern an verschiedenen Carriern mittels Immunoblot

Um die Frage nach einer Kreuzreaktivität zwischen den homologen Membranproteinen Rinderherz-SDS-AAC, SDS-UCP und -SDS-PiC zu verifizieren, wird in Abbildung 9 das Ergebnis der SDS-AAC-spezifischen Antikörper mit den Nukleotidcarriern aus verschiedenen tierischen Mitochondrialextrakten, sowie mit Hefe-AAC, SDS-UCP und SDS-PiC gezeigt. Zusätzlich dazu verdeutlicht Abbildung 9C die immunologische Spezifität der Antikörper die gegen Rinderherz-CAT-AAC-Amberlite gerichtet sind. Überschüssiges Triton X-100, als Detergenz zur Solubilisierung dieses Proteins im Gebrauch, wurde vor der Immunisierung mit Hilfe des Ionenaustauschers Amberlite entfernt. Die Reaktion der Antikörper gegen natives UCP (n-UCP) und gegen denaturiertem SDS-Neurospora-crasa-AAC vervollständigt das Bild vom Bindungsverhalten der polyklonalen Kaninchen-Antikörper. Die gegen Rinderherz-AAC (9A) und gegen Neurospora-crasa SDS-AAC (9B) gerichteten Antikörper zeigen eine deutliche Kreuzreaktivität mit SDS-UCP und mit Rinderherz-Phosphatcarrier.



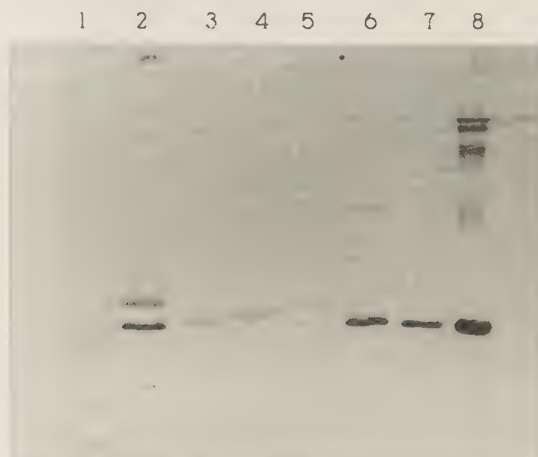
A

Abb. 9 Immunopräzipitation mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern die gegen den Rinderherz-SDS-AAC gerichtet sind mit verschiedenen Carrier-Antigenen. Pro Tasche wurde je 5 µg Protein auf ein kleines 12%iges Laemmli-Gel aufgetragen und transferiert. Antikörper-Verdünnung: 1 : 500; 1: mitochondrialer Hefeextrakt; 2: Rinderherz-Phosphatcarrier; 3: Hefe-AAC; 4: Uncoupling Protein; 5: Rattenleber-AAC; 6: Rindernieren-AAC; 7: Rinderherz-AAC;



B:

B: Neurospora crassa-AAC spezifische Antikörper; Verdünnung: 1 : 500
 1: Rinderherz-Phosphatcarrier; 2: *Neurospora-crassa*-AAC; 3: *Hefe*-AAC (Wildtyp); 4: Uncoupling Protein; 5: Rattenleber-AAC; 6: Rindernieren-AAC; 7: Rinderherz-AAC;



*C: Antikörper gegen den Rinderherz-CAT-AAC nach schonender Abreicherung des überschüssigen Triton-X-100 mit Hilfe von Amberlite. Antikörper-Verdünnung 1 : 500; 1: Cytochrom-b; 2: Rinderherz-Phosphatcarrier; 3: *Neurospora-crassa*-AAC; 4: *Hefe*-AAC; 5: Uncoupling Protein; 6: Rattenleber-AAC; 7: Rindernieren-AAC; 8: Rinderherz-AAC;*

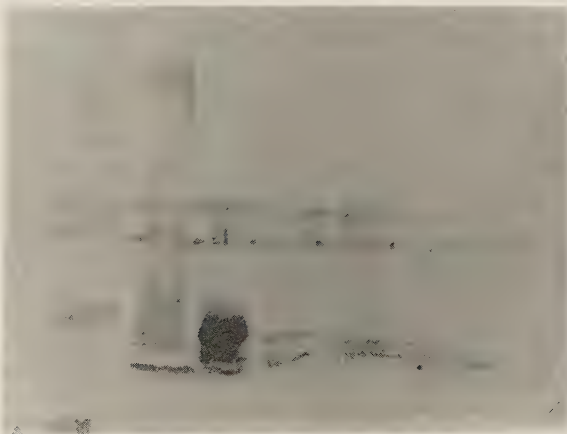


D

D: Antikörper gegen den SDS-denaturierten Phosphatcarrier aus Rinderherz-mitochondrien; Verdünnung: 1 : 500

1: Rinderherz-Phosphatcarrier; 2: *Neurospora-crassa*-AAC; 3: Hefe-AAC (Wildtyp); 4: Uncoupling Protein; 5: Rattenleber-AAC; 6: Rindernieren-AAC; 7: Rinderherz-AAC;

1 2 3 4 5 6 7

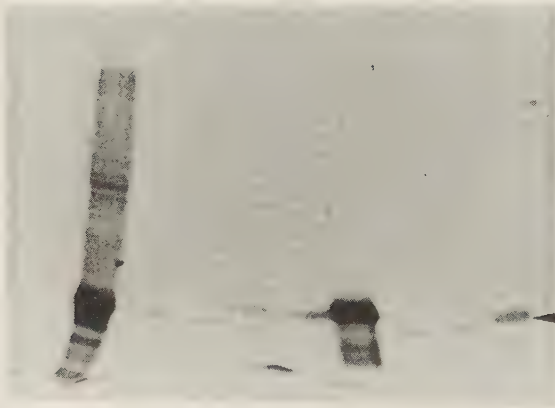


E

E: Antikörper gegen SDS-denaturiertes Uncoupling Protein Verdünnung: 1 : 500
Neurospora crassa-AAC spezifische Antikörper; Verdünnung: 1 : 500

1: Rinderherz-Phosphatcarrier; 2: *Neurospora-crassa*-AAC; 3: Hefe-AAC (Wildtyp); 4: Uncoupling Protein; 5: Rattenleber-AAC; 6: Rindernieren-AAC; 7: Rinderherz-AAC;

1 2 3 4 5 6 7 8



F

F: Antikörper gegen SDS-denaturiertes Uncoupling Protein aus einer F₁ (Balb-C x C57 BL 6) Maus 9; Antikörper-Verdünnung: 1 : 500; 1: UCP-haltiger Mitochondrialextrakt; 2: Rinderherz-Phosphatcarrier; 3: *Neurospora-crassa*-AAC; 4: Hefe-AAC (Wildtyp); 5: Uncoupling Protein; 6: Rattenleber-AAC; 7: Rindernieren-AAC; 8: Rinderherz-AAC;

1 2 3 4 5 6 7



G

G: Antikörper gegen natives Uncoupling Protein; Verdünnung: 1 : 500; 1: Rinderherz-Phosphatcarrier; 2: *Neurospora-crassa*-AAC; 3: Hefe-AAC (Wildtyp); 4: Uncoupling Protein; 5: Rattenleber-AAC; 6: Rindernieren AAC; 7: Rinderherz-AAC;

Die gegen nativen Rinderherz CAT-AAC (9C) und gegen natives Uncoupling Protein gerichteten polyklonalen Antikörper (9G) kreuzreagieren ebenfalls mit dem Rinderherz-Phosphatcarrier. Alle übrigen Kaninchen Antikörper erkennen im Immunoblot jeweils ihre spezifischen Antigene. Hefe-AAC (Wildtyp) reagiert von allen AAC-Antigenen mit polyklonalen Antikörpern gegen Rinderherz-SDS-AAC, SDS-denaturiertem *Neurospora crassa*-AAC und Rinderherz-CAT-AAC am schwächsten (9A, 9B, 9C). Die Antikörper gegen CAT-AAC nach schonender Behandlung mit Amberlite zeigen dagegen keine Reaktivität mit SDS-UCP. Eine mögliche Erklärung dafür könnte darin liegen, daß bei diesen Antigen keine kreuzreagierenden Antikörper gegen UCP gebildet werden. Das kreuzreagierende Epitop wird wahrscheinlich durch Denaturierung von Rinderherz-AAC und *Neurospora crassa*-AAC immunogen. Bei schonender Behandlung von Rinderherz-CAT-AAC mit Amberlite werden hingegen kaum Antikörper gegen dieses Epitop gebildet. Die Antikörper gegen Rinderherz-SDS-AAC reagieren schwach mit der phospholipidhaltigen Lauffront. Dies ist ein Indiz für eine Kreuzreaktivität dieser pAk mit Phospholipid.

Die Frage nach einem immunologisch nachweisbaren sequenzabhängigen kreuzreagierenden Epitop zwischen Rinderherz-AAC, -PIC und Uncoupling Protein läßt sich mit Hilfe von pAk noch nicht hinreichend sicher beantworten. Zur Klärung dieser Frage werden daher mAk benötigt. Die deutliche Sequenzhomologie zwischen den homologen Carriern, Rinderherz-AAC, -PIC und dem Uncoupling Protein läßt dies erwarten (Aquila et al. 1985).

Die gegen SDS-UCP gerichteten Antikörper von Maus 9 reagieren im Immunoblot gegenüber den entsprechenden Antikörpern aus Kaninchen deutlich stärker mit Rinderherz-AAC (Abb. 9F). Dies läßt sich durch die gegenüber anderen Inzuchtstämmen größere Neigung der F₁-Mäuse zu einer Immunantwort mit größerer Variationsbreite erklären (Klein et al. 1975). Dieses Bindungsverhalten zeigen ebenfalls die SDS-AAC- und CAT-AAC-Amberlite-spezifischen Antikörper (Abb. 9A, E). - Die Antikörper gegen SDS-AAC reagieren schwach mit der phospholipidhaltigen Lauffront. Dies ist ein Indiz für eine Kreuzreaktivität dieser polyklonalen Antikörper mit Phospholipid. Der Nachweis einer Reaktion von Antikörpern am Phosphatcarrier ist, wegen seines hydrophoben Charakters und seiner verbundenen Neigung zur Aggregation im Immunoblot nur schwer zu erbringen.

3.2. Selektion und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen den Nukleotidcarrier

Im Abschnitt 3.2. wird auf die Kriterien für die Auswahl der Mäuse näher eingegangen, deren stimulierte Lymphoblasten für alle folgenden Arbeiten die Grundlage bildeten. Die funktionsspezifischen Antikörper sind nicht nur als Kontrolle für den nativen Zustand des ADP/ATP Carriers während der Bildung der Immunantwort wichtig, sondern sie können auch einen Einblick in Struktur-Funktionswechselwirkungen aus immunologischer Sicht geben. Eine Charakterisierung aller monoklonalen Antikörper gegen den AAC schließt sich an. Abschließend wird noch auf die Existenz einer mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern nachweisbaren molekularen Mimikry zwischen zwei nicht homologen Proteinen, dem Rinderherz-AAC und dem variablen Teil der λ_3 -Kette eines humanen IgG eingegangen.

3.2.1. Auswahlverfahren der Mäuse nach funktionellen Kriterien

Da die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von funktionell hemmenden Antikörpern gering ist, nutzten wir die genetische Variationsbreite der Immunantwort von 30 F_1 -Mäusen (Balb-C x C57 BL6), um die Antikörper mit der erwünschten Spezifität zu erhalten. Die anschließende Selektion der Tiere orientierte sich an der Produktion von spezifischem, hochaffinen IgG-Antikörpern mit einer Spezifität für Rinderherz-CAT-AAC. Außerdem erfolgte eine Auswahl der Mäuse nach Antikörpern, welche den Nukleotidtransport am rekonstituierten Rinderherz-AAC hemmen können. Dieses Antigen, welches ohne den Schutz durch den Inhibitor CAT oder durch Liposomen in kurzer Zeit proteolytisch abgebaut wird (Krämer et al. 1979) bot sich auch als ELISA-Testsystem an. Wir befürchteten aber, daß die am Nukleotidtransport beteiligten konformationsabhängigen Epitope (Buchanan 1976) durch eine Bindung dieses Testantigens an die Oberfläche der Testplatten so beeinträchtigt werden (Van Leaven et al. 1988), so daß die funktionell inhibierenden Antikörper nicht mehr am AAC

binden können. Deshalb griffen wir auf das aufwendigere Verfahren einer Selektion dieser Antikörper in flüssiger Phase zurück (Hiskore et al. 1988). Dazu wurde der DAN-AMP-Fluoreszenztest am rekonstruierten AAC genutzt (Klingenberg 1986 a). Diese Methode erwies sich als sehr empfindlich, konnte aber ebenso wie der Test des Nukleotidaustausches, die funktionell hemmenden Antikörper nicht nach ihrer Klasse differenzieren (sh. Pos. 3 im Anhang).

In Abbildung 10 wird das Ergebnis des IgG-spezifischen ELISA auf Rinderherz-CAT-AAC als Testantigen gezeigt. Man kann dabei erkennen, daß in den Seren von sieben Tieren trotz einer Langzeitimmunisierung über acht Monate keine spezifischen IgG-Antikörper gegen Rinderherz-CAT-AAC nachgewiesen werden konnten.

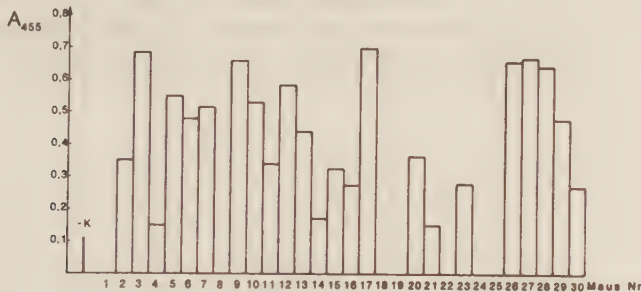


Abb.10 ELISA-Bindungstest von polyklonalen Maus-Antikörpern immunisierter Mäuse an nativem CAT-AAC zur Selektion der Mäuse. - Diese Abbildung zeigt die Absorption der Substratreaktion bei einer Antikörper-Verdünnung von 1 : 100 (Ordinate); Abszisse: Nummer der immunisierten Mäuse; die Kontrolle mit Hilfe des präimmunisierten Antikörpers (-K) wird durch einen dünnen Strich markiert.

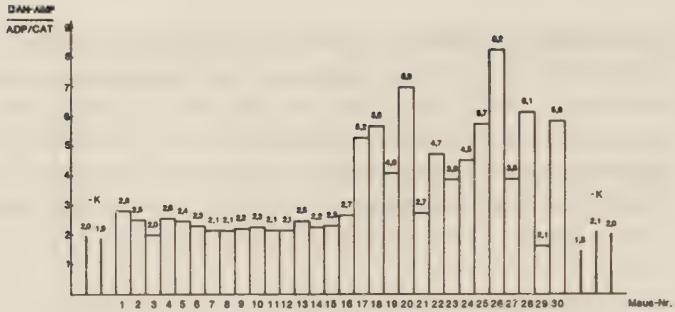


Abb. 11 Selektion der polyklonalen Antikörper nach funktionell hemmender Aktivität mit Hilfe des DAN-AMP Fluoreszenztests. - Die Meßergebnisse sind dabei gegenüber Anhang Pos. 3 als Verhältnis des Ausschlages DAN-AMP/CAT-ADP aufgetragen. Für jede Messung wurden 5 µl 1 : 10 verdünntes Antiserum verwendet. Ordinate: Verhältnis des DAN-AMP zum ADP/CAT-Effekt in relativen Einheiten. Abszisse: Die Zahlen 1 bis 30 bezeichnen die immunisierten Mäuse; die Kontrollen nach Zugabe einer gleichen Menge präimmunem Mausserum werden durch einen dünnen Strich markiert.

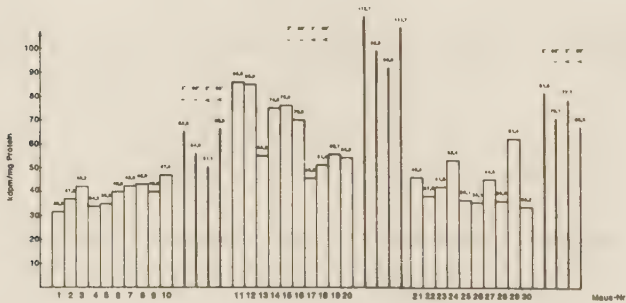


Abb. 12 Selektion der polyklonalen Antikörper mit funktionell hemmender Aktivität durch Inhibition des ^{14}C -ATP Austausches am rekonstituierten Rinderherz-AAC.

2', 60' : ^{14}C -ATP Austausch von 10 Sekunden Dauer ohne Antikörper nach einer Inkubationszeit von 2 bzw. 10 Minuten
2', 60' C-ATP Austausch nach Zugabe von 5 µl 1 : 10 verdünntem präimmunem polyklonalen Antikörpern.
Ordinate: 10^3 dpm/mg Protein bezeichnet die ^{14}C -ATP Austauschaktivität des rekonstituierten AAC; Abszisse: Die Zahlen 1 bis 30 bezeichnen jeweils die immunisierten Mäuse. Die Kontrollen, welche durch dünne Striche markiert sind, beziehen sich jeweils auf die vorhergehenden zehn getesteten Serien.

In den anschließenden Abbildungen 11 und 12 werden die Ergebnisse der Selektion von Mäusen, welche Antikörper mit funktionell hemmender Aktivität produzieren, veranschaulicht. Besonders gut zeigt Abbildung 11 den Unterschied in den zwei vom Züchter (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover) gelieferten Mäusechargen (Tier 1-15 bzw. 16-30). Es wird dabei deutlich, daß die Tiere 16-30 überwiegend funktionell hemmende Antikörper produzieren. Da alle Tiere gleiches Alter und Geschlecht hatten, kann man vermuten, daß unterschiedliche Haltungsbedingungen beim Züchter für dieses Ergebnis verantwortlich sind.

Gegenüber der Hemmung des Nukleotidaustausches unterscheidet das DAN-AMP-Fluoreszenz Testsystem deutlicher zwischen den Antikörpern, welche die Transportfunktion des AAC schwach bzw. stark hemmen können. Das Fluoreszenz-Testsystem war besser für längere Inkubationszeiten (12h - 36h) der Proteoliposomen geeignet als der Nukleotid-Austausch. Die langen Inkubationszeiten erklären sich durch das zeitraubende Testverfahren der DAN-AMP Fluoreszenz. Dabei werden die Kulturüberstände der Hybridomaklone nacheinander einzeln auf funktionell hemmende Aktivität geprüft. Dieses Vorgehen erwies sich beim Test einer großen Anzahl von Kulturüberbeständen praktikabler als der Test dieser Überbestände im Nukleotidaustausch. Das bessere Differenzierungsvermögen dieses Testsystems war der entscheidende Grund dafür dieses zur Vorauswahl der Hybridomaklone zu verwenden. Im methodischen Teil dieser Arbeit wird noch auf einige Einzelheiten näher eingegangen. Ein Vergleich der Signifikanz beider Testsysteme wird im Anhang, Pos. 4 veranschaulicht.

Die Antikörper von Tier 26 zeigten in allen funktionellen Testsystemen und im CAT-AAC-ELISA die höchste funktionelle Hemmung und Reaktivität von IgG-Antikörpern gegen CAT-AAC. Deshalb wurde dieses Tier für die Fusion ausgewählt. Die gegen Rinderherz-CAT-AAC gebildeten Antikörper von Tier 4 zeigten hingegen eine funktionell hemmende Aktivität. Diese reagierten aber nur sehr mäßig mit CAT-AAC im IgG-spezifischen ELISA. Deshalb wurden die Milzzellen dieses Tieres anfangs für Kontrollzwecke für die Dop-

pelfusion verwendet. Die hemmenden Eigenschaften der Antikörper von Tier 26 zeigt Abbildung 13. Dabei läßt sich eine Hemmung des Nukleotidaustausches nach Titration von maximal 100% nachweisen. Die Antikörper von Tier 4 hingegen, hemmen den Nukleotidtransport kreuzreagieren aber ebenfalls mit denaturierter einzelsträngiger DNS, wie Abbildung 14 zeigt. Polyklonale Antikörper gegen unmarkierten und nativ rekonstituierten AAC als Antigen, die zusätzlich gewonnen wurden, zeigten keine Hemmung des Nukleotidtransportes.

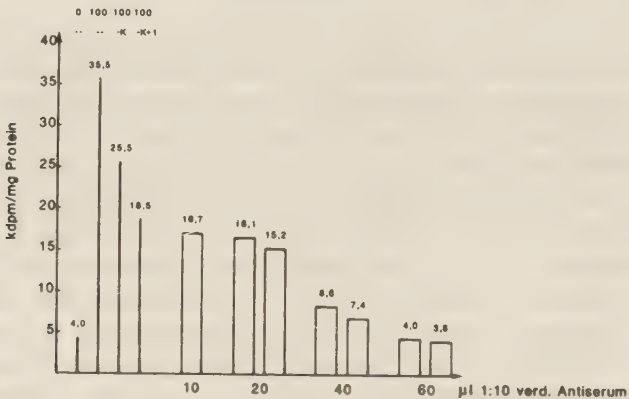


Abb. 13 Titration der Hemmung des ^{14}C -ATP-Austausches nach Zugabe von polyklonalen Antikörpern gegen Rinderherz-AAC. Nach einstündiger Inkubation des rekonstituierten Rinderherz-AAC mit steigenden Mengen an polyklonalen Antikörpern wurde deren Einfluß auf die Aktivität des Nukleotidaustausches getestet.

0 : Leerwert; 100 : ^{14}C -ATP Austausch ohne polyklonale Antikörper

-K : ^{14}C -ATP Austausch nach Zugabe von 60 µl 1 : 10 verdünntem präimmunem polyklonalen Antikörpern

-K+1: ^{14}C -ATP-Austausch nach Zugabe von 60 µl 1 : 10 verdünntem präimmunem polyklonalen Antikörpern

Ordinate: 10 dpm/mg Protein bezeichnet die ^{14}C -ATP Austauschaktivität des rekonstituierten AAC; Abszisse: Die Zahlen 1 bis 30 bezeichnen jeweils die immunisierten Mäuse. Die Kontrollen, welche durch dünne Striche markiert sind, beziehen sich jeweils auf die vorhergehenden zehn getesteten Seren.

Antikörper, die gegen SDS-AAC gerichtet sind, erlauben Aussagen über die Lage und Größe der Region, welche für die Immunogenität des ADP/ATP Carriers hauptsächlich verantwortlich ist. Außerdem wird erwartet, daß durch Fällung mit TCA/Aceton und Denaturierung mit SDS der Anteil an kreuzreagierenden cardiolipinspezifischen Antikörpern am AAC verringert wird.

Die Titer der polyklonalen Antikörper der Tiere 2 und 4, die mit Rinderherz-SDS-AAC immunisiert worden waren, betragen $1 : 10^5$ bzw. $1 : 50000$. Die Antikörper von Tier 4 unterscheiden sich aber durch ihre Kreuzreaktivität gegenüber Rinderherz-CAT-AAC, bzw. rekonstituiertem Herz-AAC. Die Antikörper von Tier 2 zeigen dagegen eine Spezifität für rekonstituierten AAC. Deshalb wurden diese beiden Tiere für die Fusion III ausgewählt (Tab. 1). Rekonstituierter AAC fand wegen des spezifischen Reaktionsverhaltens der Antikörper von Tier 2 anfangs als zusätzliches Testsystem Verwendung. Leider blieb der dabei erhaltene Hybridomaklon 3 G4 nicht in seiner Antikörperproduktion stabil.

Tabelle 1 Zusammenfassung der Elisa-Bindungsmessungen von SDS-AAC-pAk

Die Kreuzreaktivität mit CAT-AAC und rekonstituiertem AAC wurde bei einer Serumverdünnung von $1 : 400$ bestimmt.

Maus-Nr.	CAT-AAC	-Kontrolle	rek. AAC	-Kontrolle	Endtiter (SDS-AAC)
1	0,250	0,309	0,37	0,189	$1 : 2000$
2	0,32		0,469		$1 : 10^5$
3	0,37		0,508		$1 : 6000$
4	0,668		1,087		$1 : 60000$
5	0,310		0,297		$1 : 6000$

Tiere Nr. 2 und 4 wurden für die Fusion ausgewählt.

3.2.3. Test der selektierten, monoklonalen Antikörper mit einer Reaktivität für nativen CAT-AAC im ADP/ATP Austausch

Um mit erfolgversprechender Wahrscheinlichkeit funktionell hemmende polyklonale Antikörper zu erhalten, wurde CAT-AAC als Antigen für die Immunisierung verwendet. Auf membrangebundenen AAC als natives Antigen, wie es in Mitochondrien und Mitoblsten vorkommt, wurde verzichtet. Die Gründe dafür liegen in der Vielzahl der möglichen Kreuzreaktivitäten der überwiegend auftretenden übrigen mitochondrialen Proteine (ca. 88%). Der Einfluß dieser Proteine auf die Zusammensetzung der Immunantwort überwiegt nach unserer Meinung den positiven Einfluß auf die Bildung von funktionell hemmenden Antikörpern bei weitem. Den größten Anteil daran hätte der native Charakter des Antigens, welches in mitochondrialen Membranstrukturen eingebettet bleibt. Der Schutz des CAT gebundenen AAC vor Abbau durch Proteasen ist bekannt und gibt eine gewisse Gewähr dafür, daß das empfindliche Bindungszentrum dieses Transportproteins für eine gewisse Zeit vor Abbau durch lipo-proteolytische Prozesse im immunisierten Tier geschützt wird.

Im Gegensatz zum Rinderherz-CAT-AAC, der von uns verwendet wurde, nutzte Carrasco et al. (1982) in einer vergleichbaren Arbeit lyophilisierten Laktosecarrier als Antigen für das Testsystem und für die Immunisierung. Offensichtlich läßt dies die wesentlich widerstandsfähigere nicht ligandierte Struktur dieses Transportproteins zu. Die empfindlichere Struktur des ADP/ATP Carrier ließ erwarten, daß keine funktionell hemmenden Antikörper gebildet werden. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der Fluoreszenzmessung eines monoklonalen IgM-Subklones, der funktionell hemmende Eigenschaften zeigt. Ein Nachteil des verwendeten, sehr empfindlichen DAN-AMP-Fluoreszenz Testsystems liegt im Albuminanteil des foetalen Rinderserums, welches als Zusatz zum Kulturmedium erforderlich ist. Bei den Konzentrationen von 0,2 - 0,6% Albumin bindet dieses auch DAN-AMP. Der Übergang vom matrix- in den cytosolischen Zustand des AAC nach Zugabe von CAT und ADP wird dadurch aber nicht beeinflusst. Ein vergleichba-

rer Abfall der Fluoreszenz nach Zugabe von Borkregat (BKA) wird in einer Lösung mit einem Anteil von max. 1% Albumin nur erreicht, falls größere Mengen an BKA verwendet werden (sh. Pos. 5 im Anhang). Aminopterin, als Zusatz zum Selektionsmedium in Gebrauch, zeigt ebenfalls Fluoreszenzeigenschaften. Diese Substanz zeigt in einem Excitationsspektrum gegen 524 nm (Emissionswellenlänge) einen Gipfel bei 367 nm. Dies beeinträchtigt aber das Fluoreszenzverhalten im DAN-AMP-Testsystem nicht.

Um die Ergebnisse dieses Testsystems zu verifizieren wurden die monoklonalen Antikörper mit Hilfe des Austauschtests nochmals in einigen ausgewählten Fällen auf ihre funktionell hemmenden Eigenschaften hin überprüft. Dabei zeigten die monoklonalen Antikörper des Klones 7G11-A1- aus Kulturüberständen, die zur IgM-Klasse gehören, eine Hemmung des Austausches von 50%.

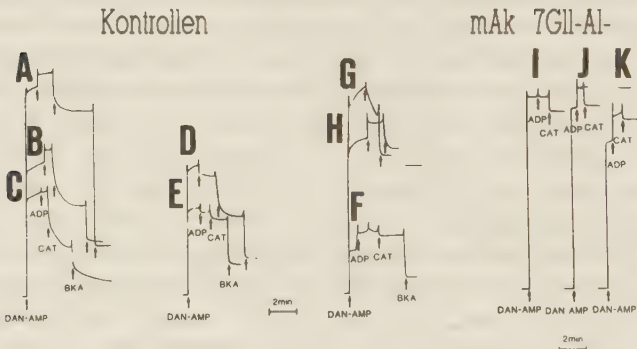


Abb. 15 Hemmung des m-, c-Überganges durch je 90 μ l monoklonaler Antikörper aus Kulturüberständen des Hybridomaklonen 7G11-A1- nach der 2. Reklonierung. - Die DAN-AMP Fluoreszenzmessungen wurden mit einer Empfindlichkeit von 2,5 mV durchgeführt. Teil A zeigt als Kontrolle die DAN-AMP Fluoreszenz im Graphen A ohne rekonstituierten Rinderherz-AAC Antigen in 20 mM Tris-Puffer + 90 μ l 1 : 10 verdünntem präimmunes Serum. B: Rekonstituierter AAC in 20 mM Tris-Puffer; C: Rekonstituierter AAC in 20 mM Tris-Puffer + 90 μ l 1 : 10 verdünntes präimmunes Serum; Graph D zeigt eine Wiederholung des Test von C. Graph E veranschaulicht das Bindungsverhalten nach Zugabe von 5 μ l 1 : 10 verdünnten polyklonalen Antikörpern mit funktionell hemmender Aktivität in der DAN-AMP. Fluoreszenz ohne Antigen in einem 20 mM Tris-Puffer unter Zusatz von 20% foetalem Rinderserum wie Graph A. Graph G und H zeigen die Wiederholung von Test A. Die Graphen I-K zeigen abschliessend das Fluoreszenzverhalten nach Zugabe von 90 μ l Kulturmedium, welches funktionell hemmende monoklonale Antikörper enthielt.

Dies zeigt Abbildung 16. Der monoklonale Antikörper 7G11-A1-B5 hemmt die Aktivität des ^{14}C -ATP Austausches von 27,4 kdpm/mg Protein auf 14,2 kdpm/mg Protein.

Der mAk 13D4 bindet ebenso wie der funktionell inhibierende Antikörper 7G11-A1 an Rinderherz-CAT-AAC. Dabei reagieren beide monoklonale Antikörper mit leicht zugänglichem Cardiolipin auf der Oberfläche des AAC. Nur der Antikörper 7G11 kann aber Transportfunktionen des AAC hemmen. Dies veranschaulicht Abb. 17. Der affinitätschromatographisch gereinigte IgG₁ Antikörper 13D4, der gegen den Rinderherz-CAT-AAC gerichtet ist, hemmt den Übergang vom matrix- in den cytosolischen Zustand nicht. Für die Selektion dieses mAk wurden Milzzellen von Maus 4 fusioniert, die kaum IgG-Antikörper produzierten, welche mit dem Rinderherz-CAT-AAC reagieren können. Dies legt den Schluß nahe, daß diese IgG-Antikörper durch die spontane Mutation von IgM-produzierenden Hybridomaklonen entstanden sind.

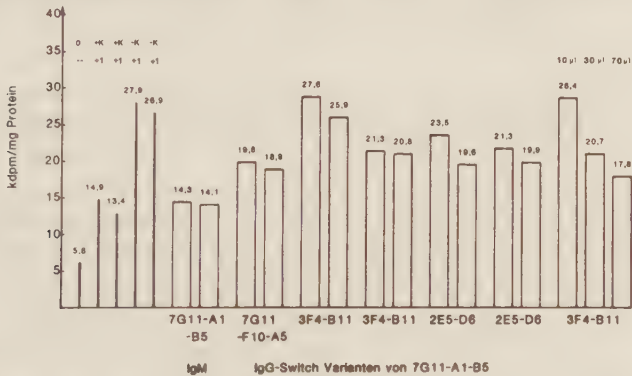


Abb. 16 Bestimmung der funktionellen Hemmung von mehrmals reklonierten, monoklonalen Antikörpern im Nukleotidaustausch. - Es wurden 30 μl 1 : 10 verdünntes Antiserums bzw. 30 μl Kulturüberstand, der monoklonale Antikörper enthielt, zugegeben. 0 : Leerwert; + $\frac{K}{1}$: 30 μl 1 : 10 verdünnter funktionell hemmender polyklonales Antiserum nach einstündiger Inkubation; + $\frac{K}{1}$: 30 μl 1 : 10 verdünntes präimmunes Antiserum nach einstündiger Inkubation. Ordinate: 10^3 dpm/mg Protein bezeichnet die ^{14}C -ATP Austauschaktivität des rekonstituierten AAC. Abszisse: Die Kontrollen sind durch schmale Striche markiert; die selektierten IgG-Switch-Varianten 3F4 und 2E5 sind aus dem Subklon 7G11-A1 kloniert worden.

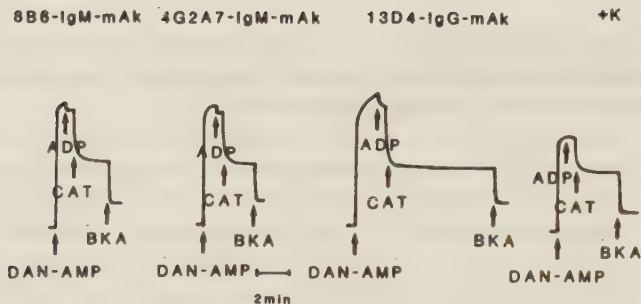


Abb. 17 DAN-AMP-Fluoreszenz zur Hemmung des m-, c- Überganges von gereinigten Antikörpern am rekonstituierten Nukleotidcarrier. - Der funktionell aktiv rekonstituierte ADP/ATP Carrier wurde mit 3,5 pMolen gereinigtem, an Rinderherz-CAT-AAC bindendem IgM- bzw. IgG-Antikörpern über Nacht inkubiert. Anschließend wurden wie bei jedem Fluoreszenztest 10 μ M DAN-AMP, 20 μ M ADP, 17 μ M CAT und 5 μ M Bonkregat zur Küvette unter Rühren zugegeben. +K: funktionell hemmendes Rinderherz-CAT-AAC Antiserum 10 μ l 1 : 10 verdünnt.

3.2.4. Selektion von funktionell hemmenden IgM/IgG-"Switchvarianten" mittels ELISA

Der Hybridomaklon 7G11-A1-, der spezifische, funktionell hemmende IgM-Antikörper produziert, zeigt eine geringe Neigung zur Synthese von IgG-Antikörpern. Deshalb wurde versucht, in vitro, die "Switch-Variante" zu isolieren, die funktionell hemmende monoklonale IgG-Antikörper produziert. Nach mehrmaliger Reklonierung gelang es zwei aus 500 primären Kolonien zwei IgG produzierende Varianten zu isolieren, von denen eine den 14 C-ATP Austausch mit 40% hemmen kann. Eine Titration der funktionellen Hemmung des rekonstituierten AAC durch die IgG-Variante 3F4-B11 des Subklones 7G11-A1-B5 zeigt Abbildung 16.

Zusätzlich wird noch in diesem Kapitel die Reaktivität von gereinigtem IgM- und IgG-Antikörper, welche gegen Rinderherz-CAT-ACC selektiert worden waren, mit Hilfe des Fluoreszenz-Testsystems geprüft. Dabei

sollte festgestellt werden, ob diese Antikörper ebenfalls funktionell hemmende Aktivität zeigen. Wie man der Abbildung 17 entnehmen kann, ist dies nicht der Fall. Eine Reaktivität des Cardiolipin-spezifischen mAk 13D4 mit Rinderherz-CAT-AAC allein genügt offenbar nicht, um Transportfunktionen zu inhibieren. Dies bestätigten auch die Experimente mit Hilfe der DAN-AMP-Fluoreszenz. Dabei wurden gereinigte IgM-Antikörper der Hybridomaklone 8B6 und 4G11 verwendet. Diese reagieren beide mit CAT-AAC und Cardiolipin, hemmen aber den m-, c-Übergang im DAN-AMP-Fluoreszenz-Testsystems nicht. Da aber funktionell inhibierende Antikörper mit Rinderherz-CAT-AAC reagieren können, kommt man zu dem Schluß, daß die Antikörper des Hybridomaklones 7G11-A1 zusätzlich zu Oberflächenstrukturen des CAT-AAC noch ein konformationsabhängiges Epitop erkennen können.

3.2.5. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper der IgM-Klasse mit einer Spezifität für Rinderherz-CAT-AAC

Bei einer anfangs durchgeführten Probefusion wurden fünf monoklonale Antikörper der IgM-Klasse mit sehr guter Avidität selektiert. Dies verdeutlichten schon früh die Tendenz zur Selektion von IgM-spezifischen Antikörpern, die gegen Rinderherz-CAT-AAC als Testantigen gerichtet sind (siehe Tab. 2). Nach den funktionellen Tests der darauffolgenden Fusion zeigte sich diese Tendenz wieder. Dieses Mal war jedoch für die Immunisierung ein Langzeitschema verwendet worden. Da bei der Auswahl der spezifischen Hybridomaklone keine Unterscheidung zwischen funktionell hemmenden monoklonalen IgM- und IgG-Antikörpern möglich war, konnte nur mit Hilfe eines aufwendigen in vitro Verfahrens, welches sich die Eigenschaft von Hybridomaklonen zur spontanen Mutation der Immunglobulinproduktion zu Nutze macht, geeignete monoklonale Antikörper der IgG-Klasse selektiert werden (Sablitzky et al. 1982).

Der funktionell hemmende monoklonale Antikörper 7G11- der IgM-Klasse reagiert ebenfalls mit Rinderherz-CAT-AAC. Er erkennt auch Cardiolipin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin als etwa gleichartige Antigene. Der Titer dieser Reaktion beträgt dabei 1 : 6000. Nur bei Phosphatidylserin und Phosphatidylinosit beträgt der Endtiter 1 : 2000 bei einer geringeren Absorption. In der anschließenden Titration der funktionell hemmenden monoklonalen IgM-Antikörper unter Verwendung von CAT-AAC als ELISA-Testantigen

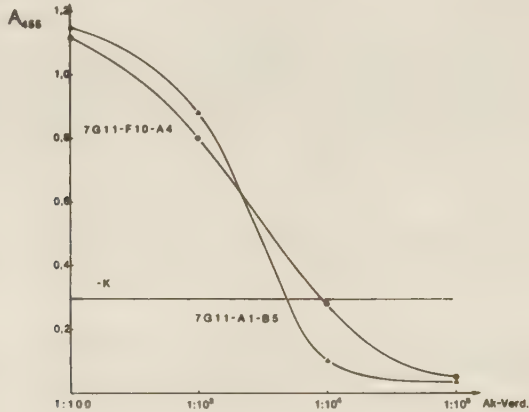


Abb. 18 Titration funktionell hemmender, monoklonaler IgM-Antikörper zur Bestimmung ihrer Avidität an CAT geschütztem Nukleotidcarrier. - (▲-▲) mAk 7G11-A1-B5; (●-●) mAk 7G11-F10-A4 Ordinate: Absorption des umgesetzten ELISA-Substrates bei 455 nm (Meßwellenlänge); Abszisse: Verdünnung des monoklonalen Antikörpers aus Kulturüberständen;

Tabelle 2 Zusammenfassung der Bindungstiter der IgM-mAk nach Titration gegen CAT-AAC

Klon Nr.	Subklon	Titer	Spezifität			
			CI/PC	PE	PI	PS
7G11- ^a	-F10-A4	1 : 10 ⁴				
	-A1-B5	1 : 10 ³ - 1 : 5000	1 : 10 ⁴	1 : 10 ⁴	1 : 3000	1 : 2000
	-F10-E1	1 : 5000				
6D5-	-A9-B8	1 : 6000				
	-A9D12	1 : 1000				
^a bezeichnet funktionell hemmende mAk						
8B6- ^b	-B2-C11	1 : 10 ⁴ - 1 : 10 ⁵				
	-E2-B1	1 : 10 ⁴ - 1 : 10 ⁵				
	-F10-E1	1 : 5000				
4G2- ^b	-A7-C5	1 : 50000				
8G8- ^b	-D12	1 : 10 ³ - 1 : 10 ⁴				
28D6 ^c		1 : 10 ⁶				

^b bezeichnet CAT-AAC bindende mAk

^c bezeichnet einen mit CAT-AAC kreuzreagierenden HIV-mAk

beträgt der Endtiter der Reaktion von zwei Subklonen des funktionell hemmenden Hybridomaklones 7GII- ca. $1 : 8000$ bzw. $1 : 10^4$ (Abb. 18). In Tabelle 3 wird ein Überblick über die verschiedenen funktionell hemmenden Hybridomaklone gegeben. Dabei wird verdeutlicht, daß der Primärklon 7GII die höchste Stabilität aller Hybridomaklone zeigt, welche Antikörper mit funktionell hemmender Aktivität produzieren. Nach der 1. Reklonierung beträgt der Anteil funktionell hemmender Antikörper dabei 23 - 32%. Im Gegensatz dazu steht der labile Hybridomaklon 6D5, der sich trotz wiederholter Reklonierung durch sehr langsames Wachstum und labile IgM-Produktion unterschied. Dabei verlor dieser Klon zuerst die Fähigkeit zur Produktion von funktionell hemmenden Antikörpern. Daran schloß sich ein Verlust der Produktion von monoklonalen Antikörpern, welche mit CAT-AAC reagieren, an. Die Hybridomaklone, die mAk gegen Phospholipide produzieren, neigen zur spontanen Mutation der Produktion von IgM zu IgG-Antikörpern. Dies stellten Thammana et al. (1983) und Wabl et al. (1985, 1986) am Beispiel von Hybridomaklonen mit Phosphatidylcholin-Spezifität fest. Dieses Verhalten ist ein Hinweis dafür, daß die mAk, die den Nukleotidtransport hemmen, mit den Phospholipid-Antikörpern verwandt sind.

Für spezifische Aussagen zur Topologie des AAC kommen monoklonale IgM-Antikörper nicht in Betracht. - Dies war auch ein Grund dafür, daß "Switch-Varianten" des Klones 7GII-A1- mit IgG-Produktion selektiert worden waren. Die Neigung der IgM-Antikörper zur Unspezifität, die in Verbindung mit der Fähigkeit der Antikörper zur Immunopräzipitation zu sehen ist, erklärt dies Vorgehen. Reaktionen dieser Antikörper können nur bei Hemmung spezifischer Eigenschaften eines Proteins, wie dem Nukleotidtransport, oder mit mehreren geeigneten Kontrollen unter Vorbehalt akzeptiert werden.

Tabelle 3 Funktionelle Hybridomaklone nach der 1. Klonierung

Primärklon	Subklone
7G11	1- -A1-4/-A7/-A9/-A11/-A12/-B1-5/-C5/-D1/-D2/-D8-11/-H5/-H6 23% 2- -A1-11/-B2/-B4/-B6/-B7/-B12/-C2/-C3/-F9/-F9/-G1-10 32%
6F4	-A1/-B4/-C8/-D6/-G7/-G9
6D4	-A5/-H1
6D11	-C4/-C7
5H7	-C4/-C7
8D3	-C4
6D5	-A9
7F10	-E12
7C10	-G8

3.2.6. Kompetitiver ELISA von gereinigten CAT-AAC-IgG-mAk zum Nachweis der Cardiolipin-Spezifität

Mit Hilfe einer für monoklonale Antikörper der IgG₁-Subklasse geeigneten Protein-A Säule konnten Antikörper aus Ascitesflüssigkeit, die mit Rinderherz-CAT-AAC reagieren, funktionell aktiv gereinigt werden. Der Bindungstiter der monoklonalen Antikörper des Klones 13D4 beträgt dabei 1 : 20000 bei ihrer Reaktion mit -CAT-AAC und Cardiolipin (siehe Abbildungen 20A und 20B). Dieser Antikörper wird durch Cardiolipin kompetitiv verdrängt, wie Abbildung 19 verdeutlicht. Denaturierte einzelsträngige DNS zeigt ähnliche kompetitive Eigenschaften. Dies erklärt sich durch die vergleichbare Struktur der antigenen Phosphatgruppen (Rauch et al. 1984).

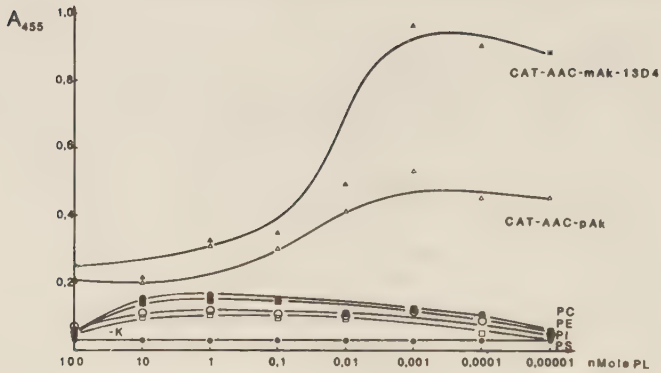


Abb. 19 Kompetitiver Cardiolipin-ELISA. - Zu Ermittlung der Bindungsspezifität eines IgG_1 -mAk, der an Rinderherz-CAT-AAC bindet, wurde Cardiolipin in micellärer Form in PBS/0,007% Tween unter Zusatz von 1% lipidfreiem BSA als Kompetitor verwendet. Die ELISA-Platte wurde mit 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cardiolipin in Na-bicarbonat-Puffer ($\text{pH} = 9.6$) + 1 mg/ml Desoxycholsäure, beschichtet. Das Cardiolipin wurde dazu vorher 10 min im Eisbad beschallt. Die übrigen Bedingungen dieses Tests sind im methodischen Teil dieser Arbeit ausführlich beschrieben. ($\blacktriangle$ - $\blacktriangle$) mAk-13D4; ($\triangle$ - $\triangle$) polyklonaler Antikörper gegen Rinderherz-CAT-AAC aus Maus 4. PC (Phosphatidylcholin), PE (Phosphatidylethanolamin) PI (Phosphatidylinosit) und PS (Phosphatidylserin) wurden als kompetitive Phospholipide ebenfalls verwendet. -K: Kompetitiver Cardiolipin-ELISA unter Verwendung von präimmunem Kontrollserum gleicher Verdünnung. Ordinate: Absorption des gemessenen ELISA-Substrates bei 455 nm (Meßwellenlänge); Abszisse: Menge an kompetitiv zugesetztem Phospholipid; die Inhibition des mAk 13D4 und des pAk 4 in o. Abb. wurde mit Cardiolipin in flüssiger Phase durchgeführt (Cl).

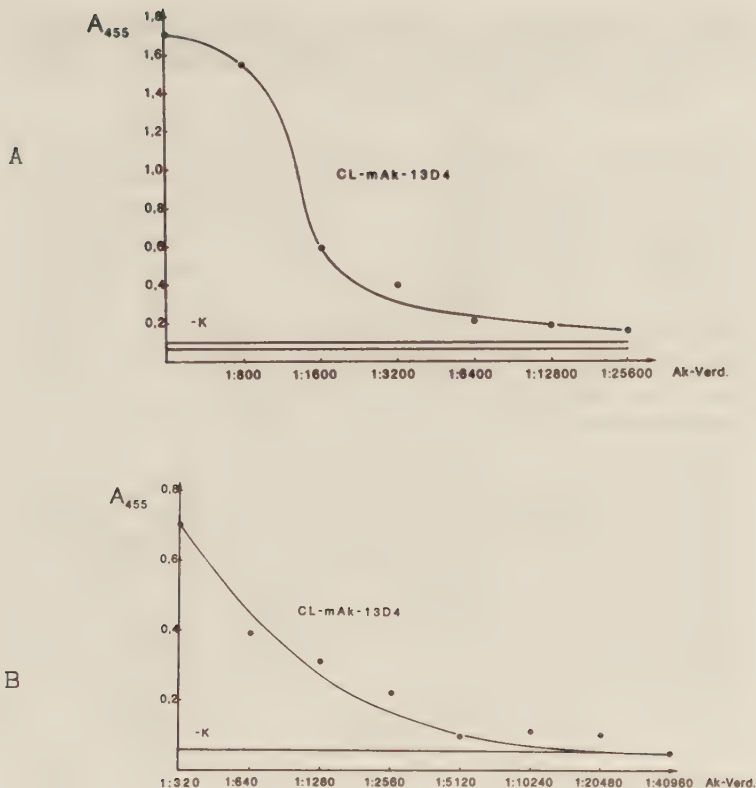


Abb. 20 Titration des Cardiolipin-spezifischen monoklonalen Antikörpers der IgG₁- Subklasse gegen Rinderherz-CAT-AAC (A) bzw. Cardiolipin (B) als Testantigen im indirekten ELISA.- Die Testplatten (Dynatech) mit hoher Bindungskapazität wurden 0,9 µg/ml Rinderherz-CAT-AAC in einem Puffer mit folgender Zusammensetzung im Eisbad beschichtet: 100mM Na₂ SO₄, 10 mM 1,4-Piperazindiethansulfonsäure, 0,05 mM EDTA, 0,05% Na-Azid, pH=7,2. Das Gewichtsverhältnis Detergenz : Protein betrug 10 : 1. Cardiolipin wurde mit 7,5 µg/ml in Na-bikarbonatpuffer pH=9,6 + 1 mg/ml Na-dodecylsulfat 10 Minuten beschallt und im Eisbad zur Beschichtung verwendet. Ordinate: Absorption des gemessenen ELISA-Substrates bei 455 nm; Abszisse: -K: Der höchste Meßwert des präimmunisierten Kontrollserums bei einer Verdünnung von 1 : 400 (Abb. 20A) bzw. 1 : 320 (Abb. 20B) ist angegeben.

3.2.7. Untersuchungen zur molekularen Mimikry eines kreuzreagierenden monoklonalen IgG-Antikörpers gegen den variablen Teil der λ -Kette eines humanen IgG

Während der Routinetest zur Selektion spezifischer monoklonaler IgG-Antikörper, die mit SDS-AAC reagieren, wurden regelmäßig Isotypkontrollen eingesetzt. Diese waren notwendig um zusätzlich die Unspezifität des gebundenen monoklonalen IgG-Antikörpers zu überprüfen. Die dafür verwendeten Kulturüberstände, die Antikörper der IgG₁ und IgG_{2a}-Subklasse enthielten, waren gegen den variablen Teil der humanen λ -Kette selektiert worden. Es zeigte sich, daß regelmäßig der monoklonale Antikörper des Klonen 5B8 mit dem Rinderherz-SDS-AAC reagiert. Das native CAT-AAC aus Rinderherzmitochondrien wird hingegen von diesem Antikörper nicht erkannt. Um dieses Ergebnis genauer zu überprüfen, wurden alle vorhandenen monoklonalen IgG-Antikörper, die gegen den variablen Teil der humanen λ -Kette selektiert worden waren (ca. 30), auf ihre Kreuzreaktivität mit dem -SDS-AAC untersucht. Es stellte sich dabei heraus, daß nur der Klon 5B8 Antikörper produziert, die an diesem Antigen binden. Dies war der Anlaß für weitere Arbeiten, bei denen nach dem Epitop geforscht wurde, das für diese Ähnlichkeit in der Struktur von zwei derartig verschiedenen Proteinen verantwortlich ist. Daher wurde als Testantigen ein tryptisches Peptid des variablen Teil des humanen λ_3 -Kette von 30 Aminosäuren Länge verwendet. Dabei zeigte sich die Kreuzreaktivität mehrerer gegen -SDS-AAC gerichteter monoklonaler Antikörper mit diesem Antigen. Die monoklonalen Antikörper der Hybridomaklone 2H12 und 7F4, welche mit dem Rinderherz-PiC kreuzreagieren, zeigen dabei gegenüber den -SDS-AAC-spezifischen monoklonalen Antikörpern 6A10 und 7H2 eine deutlich stärkere Reaktion mit dem tryptischen Peptid der λ_3 -Kette (Abb.21). Die vollständige Sequenz der λ_3 -Kette ist im Anhang, Pos. 2 abgebildet. Man kommt aufgrund dieser Versuche zu dem Schluß, daß das kreuzreagierende Epitop am AAC, welches eine größere Ähnlichkeit mit der humanen λ_3 -Kette besitzt, auch eine Bedeutung für die Struktur eines kreuzreagierenden Epitops der homologen Proteine AAC, PiC und UCP haben könnte. Dies wird noch dadurch verstärkt, daß die AAC-spezifischen monoklonalen IgG-Antikörper nicht mit diesem Peptid reagieren. Wie kürzliche ELISA-Tests zeigten, wird der kreuzreagierende monoklonale Antikörper von 2H12 durch ein synthetisches Peptid des Rinderherz-AAC gehemmt. Dieses Peptid von 14 Aminosäuren Länge hat folgende Sequenz -Y-D-T-A-K-A-M-L-P-D-P-K-N-V- und kommt in der Pos. 194-207 der Rinderherz-AAC Sequenz vor.

-SER-VAL-HIS-TRP-TYR-GLU-GLN-LYS-PRO-PLY-GLN-ALA-PRO-VAL-LEU-
-VAL-VAL-HIS-GLU-ASP-ASN-ASP-ARG-PRO-ALA-GLY-ILE-PRO-GLU-ARG-

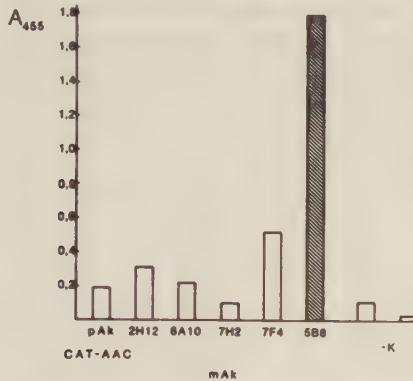


Abb. 21 Ergebnis des indirekten ELISA mit dem tryptischen Peptid der λ_3 -Kette eines humanen IgG zur molekularen Mimikry mit Rinderherz-SDS-AAC. Die Sequenz des getesteten Peptids ist oben abgebildet. -K: Kontrolle mit 1 : 400 verdünntem präimmunem Antikörper; pAk: Kontrolle mit 1 : 400 verdünntem Antikörper von Maus 26, welche mit Rinderherz-CAT-AAC immunisiert worden war. Ordinate: Absorption des gemessenen ELISA-Substrates; Abszisse: Monoklonale Antikörper aus Kulturüberständen der Fusion-II, die gegen SDS-AAC selektiert worden waren. Der monoklonale Antikörper 5B8, der gegen die λ_3 -Kette gerichtet ist (schraffiert), reagiert mit dem spezifischen tryptischen Peptid der λ_3 -Kette.

3.2.8. Titration von SDS-AAC-mAk im ELISA

Das Epitop am AAC, welches mit dem homologen Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien kreuzreagiert, stellt wahrscheinlich die hauptsächlich immunogene Region dieses Transportproteins dar. Wir kommen zu diesem Schluß, da die monoklonalen Antikörper von Fusion III mit Milzzellen, welche mit SDS-AAC immunisiert worden waren vollständig, die monoklonalen Antikörper von Fusion II mit Rinderherz-CAT-AAC als stimulierendem Antigen überwiegend dieses Bindungsverhalten zeigten. Die Titrationsversuche zeigten von den sechs monoklonalen Antikörpern, die gegen -SDS-AAC gerichtet sind und aus der Fusion von Milzzellen stammen, die mit -CAT-AAC stimuliert worden waren, einen Endtiter zwischen 1 : 1000 und 1 : 10000.

Nur der monoklonale Antikörper von Klon 2A6 unterscheidet sich dadurch von den fünf übrigen monoklonalen Antikörpern, der CAT-AAC-Fusion mit sequenzspezifischer Reaktivität, daß er trotz weiterer Klonierungen zusätzlich mit Rinderherz-CAT-AAC im ELISA kreuzreagiert. Alle anderen sequenzabhängigen mAk erkannten nur SDS-denaturierten Rinderherz-ADP/ATP-Carrier. Dieser Antikörper besitzt somit das gleiche Reaktionsverhalten, wie der monoklonale Antikörper von Klon 14G5. Jener wurde aus der dritten Fusion mit -SDS-AAC als stimulierendes Antigen, isoliert. Die polyklonalen Antikörper der für diese Fusion ausgewählten Maus 4 kreuzreagieren ebenfalls mit CAT-AAC. Man kann annehmen, daß dafür kreuzreagierende Antikörper wie 14G5 verantwortlich sind. Ein Antigen, das in geringen Mengen fest am AAC gebunden wird, kommt für diese Kreuzreaktivität primär in Frage. Man kann aufgrund der vorangegangenen Tests davon ausgehen, daß dafür geringe Mengen von fest gebundenem Cardiolipin in Frage kommt. In Tabelle 4 sind die Daten über die Anzahl, Avidität und Spezifität der monoklonalen Antikörper zusammengestellt.

3.2.9. Kompetitive Epitopbindungsanalyse von ausgewählten Rinderherz-SDS-AAC-mAk

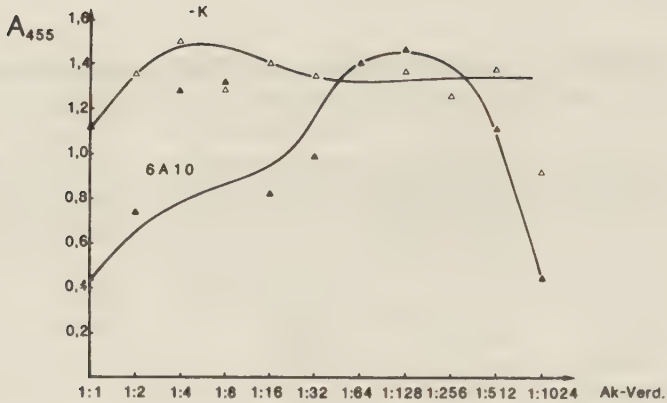
Um die Frage nach der Anzahl und Lage der verschiedenen Epitope am Rinderherz-SDS-AAC beantworten zu können, wurde die kompetitive Epitopbindungsanalyse genutzt. Dabei wurde geprüft, ob die gegen Rinderherz-SDS selektierten Antikörper an verschiedenen Bereichen der Translokatorsequenz binden können.

Es zeigte sich, daß zwei verschiedene, selektierte Antikörper an SDS-AAC binden können (Abbildung 22 A, B). Wie in Abbildung 22 C zu sehen ist, wird der Antikörper 2A6, welcher mit CAT-AAC und SDS-AAC reagiert durch den SDS-AAC-spezifischen, biotinylierten monoklonalen Antikörper 6A10 kompetitiv verdrängt. Dies ist ein Hinweis dafür, daß im Bindungsbereich dieser Antikörper wahrscheinlich das kreuzreagierende Cardiolipin fest gebunden sein könnte. Der monoklonale Antikörper 7H2 wird ebenfalls durch den spezifischen monoklonalen AAC-Antikörper 6A10 kompetitiv verdrängt (Abbildung 22 B).

Tabelle 4 Zusammenstellung aller Bindungseigenschaften der vorhandenen Antikörper gegen den ADP/ATP Carrier

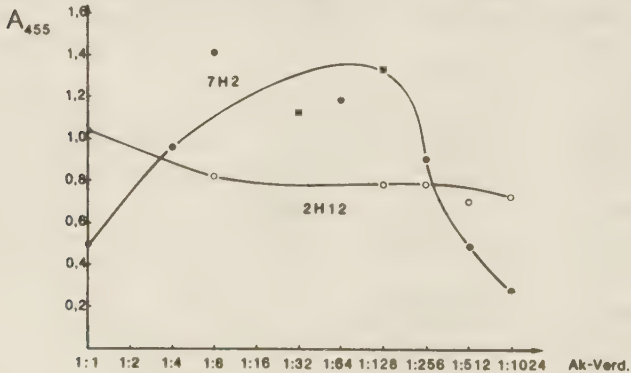
Nummer des Klonen ^a	Spezifität des Antikörpers im Immunoblot	Isotyp	ELISA CAT-AAC	Bindung an SDS-AAC	lyoph. AAC	Cardiolipin
III-11G1	AAC/Phosp.car.	IgG1		++	++	
II-2A6	AAC/PiC	IgG1	+	+	+	
III-13B3	AAC/PiC	IgG1		+		
III-14G5	AAC/PiC	IgG1	+	+	+	
III-16D12	AAC/PiC	IgG1		+		
III-3F3	AAC/PiC	IgG1		+		
III-5H6-C8	AAC/PiC	IgG1			+	
III-5H6-E2	AAC/PiC	IgG1		+	+	
III-8A5	n.b.	IgG1			+	
I-8B6	n.b.	IgM	++	n.b.	n.b.	
I-4G2	n.b.	IgM	+	n.b.	n.b.	
I-8B10	n.b.	IgM	+	n.b.	n.b.	
I-10A10	n.b.	IgM	+	n.b.	n.b.	
I-4G11	n.b.	IgM	+	n.b.	n.b.	
I-1D9	n.b.	IgM	+	n.b.	n.b.	
II-13D4-G10	AAC/PiC	IgG1	+	n.b.	n.b.	++
II-13D4-H10	n.b.	IgG3	+	n.b.	n.b.	++
II-7F4	AAC/PiC	IgG1		++	n.b.	
II-7H2	AAC	IgG1		++	n.b.	
II-6A10	AAC	IgG1		++	n.b.	
II-6H9	AAC/PiC	IgG1		++	n.b.	
II-4A11	AAC/PiC	IgG1		+	n.b.	
II-2H12	AAC/PiC	IgG1		+	n.b.	
28D6	Kreuzreagier.	IgM	+++	n.b.	n.b.	
5F4	HIV-mAk	IgG1	+	n.b.	n.b.	
5B8	Kreuzreagier. mAk gegen die λ_3 -IgG _{2a} Kette humanen IgGs			+	n.b.	

^a Römische Zahlen bezeichnen die Anzahl durchgeführter Fusionen
n.b. nicht bestimmt



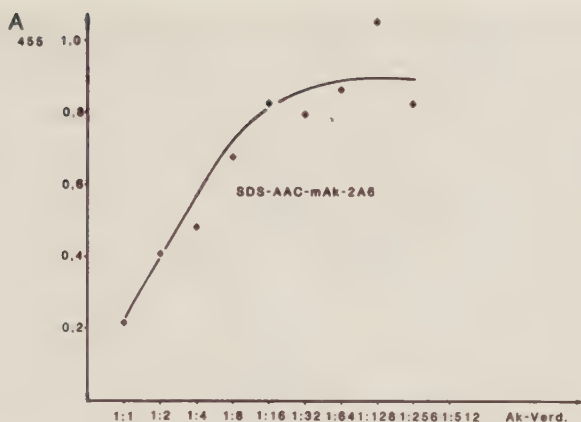
A

Abb. 22 Kompetitive Epitopbindungsanalyse. - Um eine Aussage über die Anzahl verschiedener monoklonaler Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsverhalten zu bekommen, wurde der biotinmarkierte mAk 6A10 1: 80 verdünnt und in einem Volumen von je 10 μ l zu den verschiedenen mAk aus Kulturüberständen gegeben. A Kontrollen: Biotinylierter mAk-6A10 reagiert mit unmarkiertem monoklonalem Antikörper 6A10 aus Kulturüberständen (▲▲); (ΔΔ) Myelommedium; mit Hilfe des Avidin-Peroxidase-Konjugates wird spezifisch der gebundene biotinylierte monoklonale Antikörper 6A10 nachgewiesen. Eine Titration des unmarkierten mAk zeigt bei einer kompetitiven Hemmung der Bindung beider Antikörper am denaturierten Rinderherz-AAC einen hyperbolischen Verlauf.



B

Abb. 22 Kompetitive Epitop-Bindungsanalyse (fortgesetzt); Ordinate: Absorption des gemessenen ELISA-Substrates bei 455 nm; Abszisse: Verdünnung des nichtmarkierten mAk aus Kulturüberständen; B. (○-○) mAk-2H12; (●-●) 7H2; Im Teil B wird das Bindungsverhalten von ausgewählten monoklonalen Antikörpern, welche im Immunoblot eine Spezifität für den ADP/ATP-Carrier (7H2) und zusätzlich eine Kreuzreaktivität mit dem Rinderherz-Phosphatcarrier zeigen (2H12), veranschaulicht.



C

Abb. 22 (fortgesetzt) Kompetitiver Epitopbindungsanalyse - Teil C dieser Abbildung zeigt, daß der monoklonale Antikörper 2A6 der im Immunoblot mit dem Phosphatcarrier kreuzreagiert, durch den AAC-spezifischen mAk 6A10 kompetitiv verdrängt wird. B. (○-○) mAk-2H12; (●-●) 7H2; C. (◆-◆) 2A6. Mit Hilfe des Avidin-Peroxidase-Konjugates wird spezifisch der gebundene biotinylierte monoklonale Antikörper 6A10 nachgewiesen. Eine Titration des unmarkierten mAk zeigt bei einer kompetitiven Hemmung der Bindung beider Antikörper am denaturierten Rinderherz-AAC einen hyperbolischen Verlauf.

3.2.10 Dekorierung der SDS-AAC und CAT-AAC-mAk an mitochondrialen Rinderherzextrakten nach Immunoblot

Um weitere Hinweise auf die Spezifität der monoklonalen Antikörper zu bekommen, prüften wir ihre Spezifität an mitochondrialen Rinderherz-Extrakten. Wie in Abbildung 23 dargestellt, zeigen die monoklonalen Antikörper 6A10 und 7H2 eine spezifische Reaktion mit dem ADP/ATP Carrier. Die übrigen getesteten Antikörper kreuzreagierten auch noch mit dem Phosphatcarrier (PiC). Der Cardiolipin-spezifische monoklonale Antikörper 13D4 reagiert ebenfalls mit dem PiC. Das bedeutet, daß beide homologen Proteine, der AAC und PiC, sowohl wegen des fest gebundenen Cardiolipins, als auch wegen eines sequenzabhängigen Epitops miteinander kreuzreagieren. Die Reaktionen der monoklonalen Antikörper 4A11, 7F4 und 6H9 bestätigen dieses Ergebnis. Diese Antikörper reagieren nicht mit fest gebundenem Cardiolipin. Der kreuzreagierende monoklonale

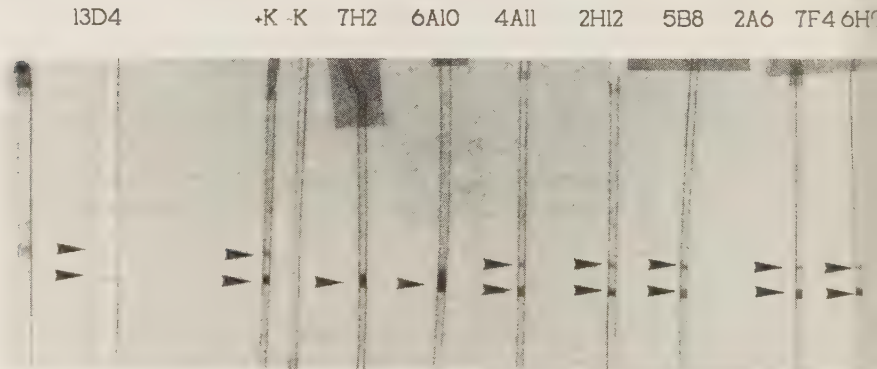


Abb.23 Bestimmung der Bindungsspezifität verschiedener mAk aus Kulturüberbeständen an mitochondrialen Rinderherzextrakten. - Die mAk aus den Kulturüberbeständen wurden 1 : 10 verdünnt, die präimmunisierten (-K) und gegen Rinderherz-CAT-AAC gerichteten Antikörper (+K) wurden ebenso wie die gereinigten Cardiolipin-spezifischen Antikörper 1 : 400 verdünnt. Pro Streifen wurden 10 µg Extrakt auf das Nitrozellulosepapier transferiert und dekoriert. Neben den sequenzabhängigen mAk 6A10, 4A11, 2H12, 2A6, 7F4 und 6H9 wurde der Cardiolipin-spezifische monoklonale Antikörper 13D4 zusätzlich noch auf seine Reaktion mit dem SDS-Rinderherz-Phosphat-Carrier im Immunoblot geprüft. 1: Rinderherz-AAC; 2: Rinderherz-Phosphat-Carrier; Streifen 1 verdeutlicht das Bindungsverhalten von gereinigtem Rinderherz-Phosphatcarrier.

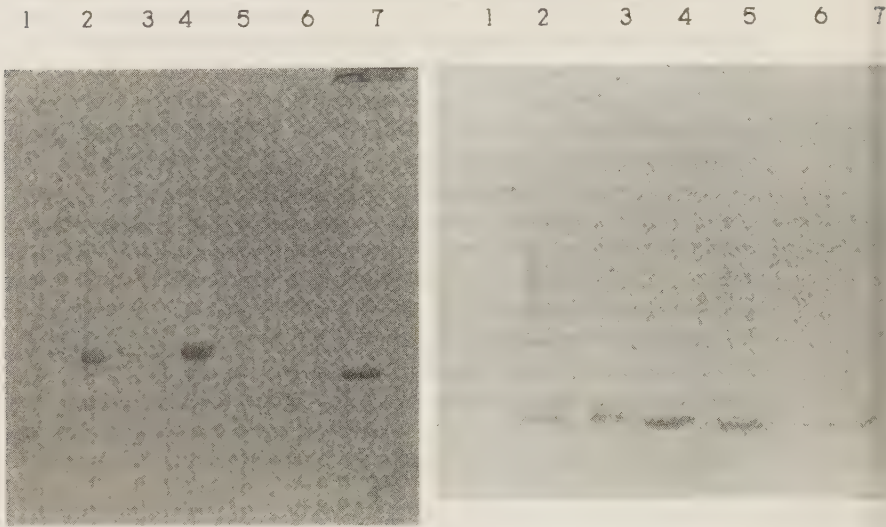
Antikörper 5B8 auf dessen Spezifität bereits in Kapitel 3.2.7 näher eingegangen wurde, reagiert ebenfalls mit den beiden homologen Proteinen. Dies spricht ebenfalls dafür, daß ein sequenzabhängiges Epitop existiert, welches für die Homologie der Carrierproteine AAC und PiC aus immunologischer Sicht von Bedeutung ist.

Ein besonders interessantes Beispiel für den maskierenden Effekt des Cardiolipins ist das Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers 2A6, der den spezifischen monoklonalen Antikörper hemmt (Abb. 22C), aber zusätzlich noch wahrscheinlich mit fest gebundenem Cardiolipin kreuzreagiert. Man muß annehmen, daß dieses im Bindungsbereich des AAC-spezifischen monoklonalen Antikörpers gebunden ist. Dies erklärt wiederum die Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers 2A6 mit dem PiC, wie Abbildung 23 zeigt. Diese Ergebnisse zeigen deutlich den maskierenden Charakter des Cardiolipins im Zusammenhang mit der Kreuzreaktivität. Dieser Anteil an der immunologischen Spezifität kann nur durch klonale Selektion vom proteinspezifischen Anteil unterschieden werden.

3.2.11. Test auf die Spezifität gegen unterschiedliche Carrierantigene nach Immunoblot

Keiner der getesteten monoklonalen Antikörper, die mit dem AAC reagieren, zeigt einen Unterschied in seinem Bindungsverhalten für tierische AAC-Antigene. Diese Antikörper erkennen ebenfalls SDS-denaturierten Hefe und -*Neurospora crassa*-AAC sowie -UCP. Der Cardiolipin-spezifische monoklonale Antikörper 13D4 zeigt bei einem Organvergleich eine deutliche Reaktion mit Herz-AAC, aber nur eine schwache Dekorierung mit Rindernieren-AAC (Abb. 24). An Rattenleber-AAC läßt sich durch diesen Antikörper, im Vergleich zum polyklonalen Cardiolipin-Antikörper kein Cardiolipin immunologisch nachweisen. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Organspezifität für Rinderherz-AAC auch durch einen erhöhten Anteil von fest gebundenem Cardiolipin am Herz-AAC erklärt werden kann. Dies könnte die Ergebnisse von Abb. 6, Kap. 3. 1. 1. erklären. Die monoklonalen Antikörper des Klonen 13D4 zeigen weiterhin eine sehr deutliche Reaktion mit SDS-UCP und mit *Neurospora-crassa*-AAC. Hefe-AAC zeigt im Unterschied dazu nur eine relativ geringe Reaktivität des gleichen Antikörpers. Dies kann man dadurch erklären, daß Hefe-AAC

(Wildtyp) unter den Bedingungen des Immunoblot leichter von anhaftendem Cardiolipin befreit werden kann, wie deutliche Reaktionen von



A

B

Abb. 24 Bindung von fest gebundenem Cardiolipin an verschiedenen Carrier-Antigenen. 5 μ g Protein wurden pro Tasche auf ein 12% Laemmli-Gel aufgetragen, transferiert und mit gereinigtem Cardiolipin-spezifischen mAk-13D4, 1: 200 verdünnt (A), bzw. mit polyklonalen Antikörpern gegen Cardiolipin 1 : 500 verdünnt (B) dekoriert. 1: Rinderherz-Phosphatcarrier; 2: *Neurospora-crassa*-AAC; 3: Hefe-AAC (Wildtyp); 4: Uncoupling Protein; 5: Rattenleber-AAC; 6: Rindernieren-AAC; 7: Herz-AAC;

polyklonalen Antikörpern gegen Hefe-AAC mit der Phospholipidhaltigen Lauffront im Immunoblot zeigten. Die Kreuzreaktion einiger monoklonaler Antikörper, die gegen Rinderherz-SDS-AAC selektiert worden waren, reagierten mit allen transferierten AAC-Antigenen gleichmäßig. Dies bedeutet, daß eine Organspezifität vorwiegend für Herz-AAC auf Sequenzebene im Immunoblot mit den transferierten Carrierantigenen nicht festgestellt werden konnte.

3.2.12. Bindungsverhalten einiger monoklonaler Antikörper an den Säurespaltstücken A₁ und A₂ des Rinderherz-AAC

Die monoklonalen Antikörper, die gegen SDS-AAC selektiert worden waren, reagieren spezifisch mit dem Säurespaltstück A₁ des Rinderherz-AAC. Es zeigten sich anfangs Schwierigkeiten im Bindungsverhalten aller verwendeten monoklonalen Antikörper mit den transferierten AAC-Fragmenten. Erst unter reduzierenden Bedingungen während der Elektrophorese, des Transfers und während der immunologischen Dekorierung konnte eine Reaktion des spezifischen monoklonalen Antikörpers II-6A10, nachgewiesen werden. Dieser gegen den SDS-Rinderherz-AAC selektierte Antikörper reagiert ebenso mit den N-terminalen Spaltstück A₁ wie der kreuzreagierende monoklonale Antikörper III-13B3 und ein monoklonaler Antikörper (IV-1H6) der gegen SDS-UCP selektiert worden war (Abbildung 26). Die Primärstruktur der beiden Säurespaltstücke ist im Anhang, Pos. 1, dargestellt.

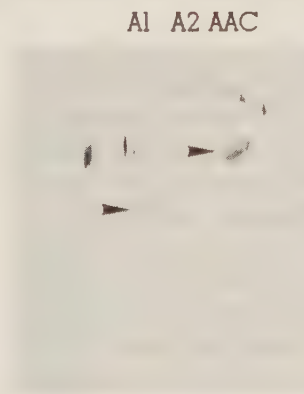


Abb.25 Bindungsversuche von monoklonalen Antikörpern an den elektroeluierten Säurespaltstücken A1 und A2 des denaturierten Rinderherz-AAC. Es wurden 5µg Protein pro Tasche aufgetragen. Die natürlichen Peptide wurden mit Hilfe eines doppelt vernetzten Schägger-Gels unter Verwendung von 10% Glycerin und 100 µM Thio glycol-säure getrennt, unter reduzierenden Bedingungen transferiert und mit Hilfe der sequenzabhängigen mAk II-6A10 (CAT-AAC Fusion), III-13B3 SDS-AAC Fusion und IV-1H6 (SDS-UCP Fusion) immunologisch dekoriert.

3.3. Monoklonale Antikörper gegen SDS-UCP

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob eine durch Antikörper nachweisbare Kreuzreaktivität des Uncoupling Proteins mit dem Rinderherz-AAC existiert. Da diese bis heute nicht nachgewiesen werden konnte, bot es sich an gegen SDS-UCP selektierte monoklonale Antikörper zur Beantwortung dieser Fragestellung einzusetzen. Die deutlich ausgeprägte Sequenzhomologie zwischen diesen beiden homologen Carriern läßt ein kreuzreagierendes Epitop erwarten (Aquila et al. 1985). Ridley et al. (1987) bestimmten bereits die Lage eines Epitops am Uncoupling Protein. Sie lokalisierten dieses am Carboxyl-Terminus dieses Proteins im Bereich des Cyanbromid-Spaltstückes-7.

3.3.1. Auswahl der Mäuse für die Fusion mit Hilfe der Spezifität der polyklonalen Antikörper für Cyanbromid-Fragmente des SDS-UCP

Um die polyklonalen Antikörper nach ihrer Bindungsspezifität besser differenzieren zu können, erfolgte eine Charakterisierung dieser Antikörper mit Hilfe von Cyanidbromid-Fragmenten des UCP. Da dieses Protein im Gegensatz zum Rinderherz-AAC in mehrere gut charakterisierte Fragmente von 18000 bis 2500 D Größe gespalten werden kann, boten sich diese Spaltstücke für ein spezifisches Testsystem an. Wie in Abbildung 27 gezeigt wird, reagieren beinahe alle polyklonalen Antikörper mit den größeren UCP-Fragmenten. Aber nur die Antikörper der Tiere 2, 3, 7, und 9 erkannten das kleinste Fragment von 6kD Größe. Die polyklonalen Antikörper von Maus 9 zeigten von allen den höchsten Bindungstitern, 1 : 25000. Deshalb wurde Maus-9 für diese Fusion ausgewählt. Da die kleinsten Peptide im normalen Tankblot innerhalb von wenigen Minuten fixiert werden und zum Transfer auf die Kathode neigen, wurden diese semitrocken auf Nitrozellulosepapier von 0,025 μ m Porengröße oder auf Immobilon^R transferiert.

3.3.2. Immunologisches Verhalten der monoklonalen Antikörper, die gegen SDS-denaturiertes Uncoupling Protein gerichtet sind

Die monoklonalen Antikörper gegen SDS-UCP reagierten mit einem Titer von etwa $1 : 10^3$ und waren damit etwa eine Größenordnung schwächer als vergleichbare Antikörper gegen SDS-AAC. Einen zusammenfassenden Überblick über die Bindungseigenschaften der monoklonalen Antikörper, die gegen SDS-UCP gerichtet sind und expandiert worden waren, vermittelt Tabelle 5.

Tabelle 5 Zusammenstellung aller expandierenden monoklonalen Antikörper gegen das Uncoupling Protein aus den Mitochondrien des braunen Fettgewebes von Hamstern.

Nummer des Klonen ^a	Isotyp	Elisa Bindung an		
		nativem UCP	SDS-UCP	lyophilisiertem UCP
IV-4G10	IgG1	-	+	+
IV-8C6	IgG1	-	+	+
IV-1H6	IgG1	-	++	++
IV-9B2	IgG1	-	+	+
IV-9D5	IgG1	-	+	+
IV-7F7	IgG1	-	+	+
IV-9H8	IgG1	-	+	+
IV-4A9	IgG1	-	+	+
IV-5G10	IgG1	-	+	+

^aRömische Zahlen bezeichnen die Anzahl durchgeführter Fusionen

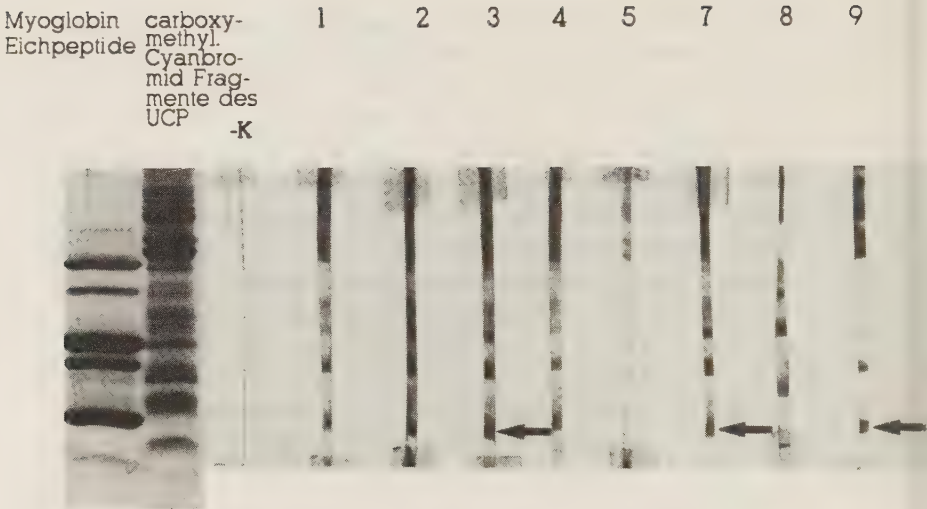


Abb. 26 Test der SDS-UCP-pAk der Mäuse 1-5 und 7-9 auf Bindung an CNBr-Peptiden. - Um die Spezifität der pAk der immunisierten Mäuse zu bestimmen, wurden die gespaltenen Peptide mit Hilfe eines doppelt vernetzten 16%igen Schügger-Gels getrennt und anschließend 8 min bei 1600 mA unter Kühlung in einem Transfersystem semitrocken auf 0,025 μ m NC-Papier in dem Puffersystem von Khyse-Andersen (1984) übertragen. Die in diesem Test besonders interessierenden Banden im Molekulargewichtsbereich 6 kD sind markiert ($\rightarrow$).

3.3.3. Test der gegen SDS-UCP selektierten Hybridomaklone auf Spezifität mit mitochondrialen Extrakten aus braunem Fettgewebe im Immunoblot

Nachdem Bindungsprobleme der monoklonalen Antikörper an SDS-UCP und an mitochondrialen Extrakten auf Nitrozellulosepapier als Trägermaterial gelöst werden konnten, wurden einige ausgewählte monoklonale Antikörper auf ihre immunologische Reaktivität mit verschiedenen AAC-Antigenen, SDS-UCP und SDS-PiC getestet. Alle monoklonalen SDS-UCP Antikörper reagierten mit Ausnahme

von IH6 mit allen transferierten Carriern. Das führt zu dem Schluß, daß der selektierte SDS-UCP Hybridomaklon IH6 Antikörper produziert, die kleine Unterschiede in der Kreuzreaktivität beim *Neurospora-crassa*-AAC erkennen können. Eine Kreuzreaktion der monoklonalen Antikörper aus Fusion IV an nativem UCP konnte im ELISA nicht festgestellt werden. Ebenso wurde eine Reaktion mit Natriumdodecylsulfat als Hapten geprüft und konnte ausgeschlossen werden.

Um bessere Aussagen über die Spezifität der monoklonalen Antikörper dieser Fusion zu bekommen, erwiesen sich kompetitive Bindungsstudien mit Hilfe des Immunoblot als notwendig.

3.3.4. Ermittlung der Spezifität der monoklonalen SDS-UCP Antikörper durch einen kompetitiven Immunoblot gegen SDS-UCP, SDS-AAC, SDS-ATPase und gegen Cardiolipin

Hemmungsversuche zur Überprüfung des Bindungsverhaltens der mAk im Immunoblot mit Hilfe von SDS-UCP, Rinderherz-SDS-AAC, -ATPase und mit Hilfe von beschalltem Cardiolipin in flüssiger Phase zeigten, daß SDS-UCP spezifisch eine Bindung des mAk-IH6 an UCP-haltigen Extrakten inhibiert. Man kommt daher zu dem Schluß, daß dieser mAk ein kreuzreagierendes Epitop auf der Oberfläche des Uncoupling Protein erkennt. Die Ergebnisse der Kontrollen zeigen keine Hinweise auf eine Unspezifität dieser Antikörper. Die anderen genannten kompetitierenden Proteine zeigten ebenso wenig eine inhibierende Wirkung wie Cardiolipin. Dies führt zu dem Schluß, daß nur SDS-UCP unter den für die immunologische Detektion erforderlichen Bedingungen eine spezifische Reaktion mit den monoklonalen SDS-UCP Antikörper IH6 eingeht. In der folgenden Abbildung 28 sind die Ergebnisse dieses Versuches abgebildet.

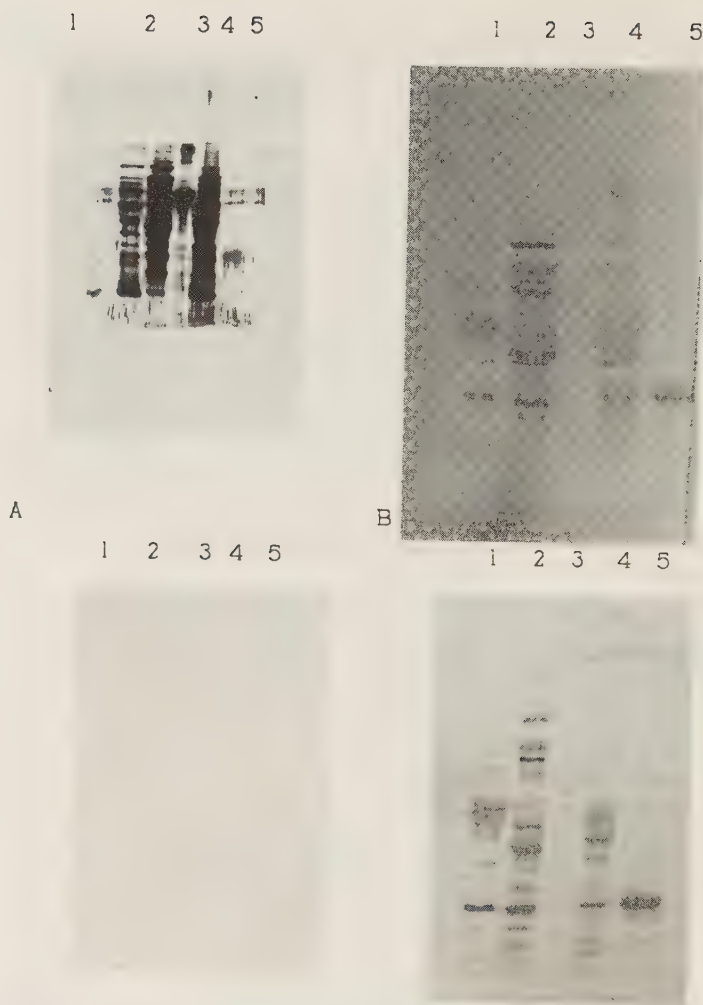


Abb. 27 Kompetitiver Immunoblot.- 50 μ g mitochondriale Extrakte aus braunem Fettgewebe von Hamstern (UCM) und aus Rinderherzmitochondrien (BHM), sowie 20 μ g ATPase und 5 μ g SDS-UCP wurden in die Taschen der 0.75 mm dicken kleinen SDS-Polyacrylamid-Gele gegeben (12% Laemmli-gel). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine, wie bereits beschrieben, transferiert und mit dem mAk-IH6 dekoriert. Der Antikörper wurde aber vorher mit dem kompetitiven Antigen eine Stunde vorinkubiert. A: Proteinfärbung; B: Kontrolle der Bindung mit IH6 ohne Kompetitor; C: mit SDS-UCP als Kompetitor; D: mit SDS-AAC; 1: ATPase; 2: mitochondrialer Rinderherzextrakt; 3: Albumin; 4: UCP-haltiger mitochondrialer Extrakt; 5: SDS-UCP

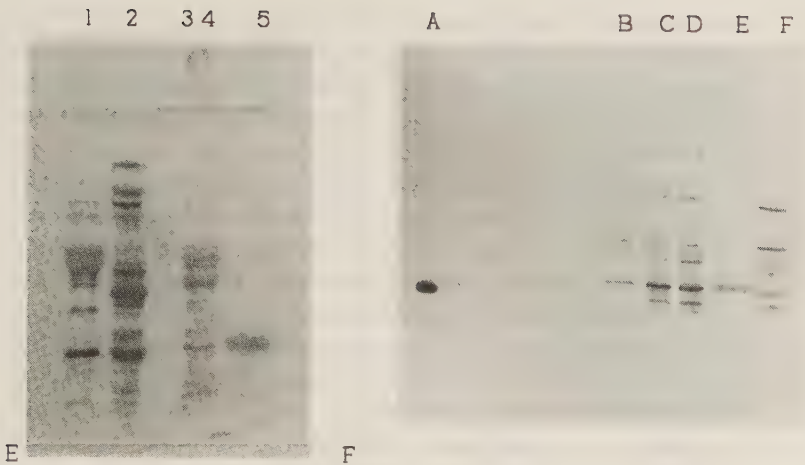


Abb. 27 (fortgesetzt) E: mit Rinderherz- F_1 -ATPase als Kompetitor in flüssiger Phase; F: mit beschalltem Cardiolipin als kompetitierendem Antigen; 1: ATPase; 2: mitochondrialer Rinderherzextrakt; 3: Albumin; 4: UCP-haltiger Mitochondrialextrakt; 5: Uncoupling Protein (zu E); A: Rinderherz-AAC; B: Oligomycin sensitives Protein; C: ATPase; D: mitochondrialer Rinderherzextrakt; E: Uncoupling Protein; F: UCP-haltiger Mitochondrialextrakt;

3.3.5. Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der verschiedenen Carrier-Antigene mit Hilfe des Immunoblots

Der monoklonale Antikörper 1H6 zeigt eine starke Kreuzreaktivität gegenüber dem Rinderherz-AAC und eine deutliche Reaktion mit Leber-, Nieren- und Hefe-AAC. Ein immunologischer Nachweis des *Neurospora-crassa*-AAC ist dagegen nicht möglich. Der mAk-1H6 unterscheidet sich von allen übrigen mAk, die gegen SDS UCP selektiert worden waren, dadurch, daß er nicht den *Neurospora-crassa*-ADP/ATP-Carrier erkennen kann. Dies zeigt, daß die monoklonalen Antikörper kleinere Abweichungen in der Struktur der sehr homologen Sequenzen erkennen können.

Polyklonale Antikörper gegen SDS-UCP aus Kaninchen und Mäusen reagieren unter nicht reduzierenden Bedingungen problemlos mit dem auf Nitrozellulosepapier aufgetüpfelten Protein ebenso gut wie mit dem transferierten UCP. Darin unterscheiden sie sich deutlich von den monoklonalen SDS-UCP Antikörpern. Dies war der Grund dafür nach Bedingungen zu suchen, die dazu führen, daß das UCP mit den sensiblen Antikörpern reagiert. Dabei waren die Ergebnisse der Arbeiten zur Vernetzung des UCP (Klingenberg et al. im Druck) unter Einfluß von Sauerstoff von Nutzen. Die Unterschiede im Bindungsverhalten liefern Hinweise dafür, daß die polyklonalen Antikörper von Kaninchen nur ein spezifisches Epitop am UCP im Bereich der letzten 11 Aminosäuren erkennen können (Ridley et al. 1987). Wie bereits früher durchgeführte tryptische Abbauten zeigten (Eckerskorn et al. 1987), wird in diesem Abschnitt der Sequenz des UCP ein stark hydrophiles C-terminales Peptid proteolytisch zugänglich. Dieses ragt wahrscheinlich aus der Membran heraus. Das kreuzreagierende Epitop am UCP ist dagegen den Konformationsänderungen dieses Proteins wesentlich stärker ausgesetzt. Deshalb gelang es, nur mit Hilfe der darauf sehr empfindlichen reagierenden monoklonalen Antikörper, Hinweise für eine Kreuzreaktion mit dem sequenzhomologen SDS-AAC zu finden. Bis jetzt konnte diese Sequenzhomologie immunologisch nicht nachgewiesen werden. Versuche zur Verbesserung der Reaktivität des SDS-UCP mit den selektierten Antikörpern in flüssiger Phase konnten zeigen, daß unter diesen Bedingungen das SDS-UCP mit den monoklonalen Antikörpern reagiert. Die danach folgende Immobilisierung und immunologische Detektion auf Nitrozellulosepapier beeinträchtigte, im Gegensatz zum indirekten immunologischen Test, den Nachweis nicht. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die Bildung von Disulfidbindungen am UCP unter Einfluß von Sauerstoff bei der Reaktion mit diesen monoklonalen Antikörpern eine wichtige Rolle spielt.

Dies erklärt die Tatsache, daß das kreuzreagierende Epitop des SDS-UCP unter nicht reduzierenden Bedingungen bis jetzt nicht nachgewiesen werden konnte.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung der polyklonalen Antikörper gegen den ADP/ATP Carrier

Wie bereits anfangs erwähnt, beschrieben mehrere Autoren die Organspezifität des ADP/ATP Carriers. Auf die Bedeutung des AAC als Autoantigen wurde von Schultheiß et al. (1986) hingewiesen. Es war nun Gegenstand dieser Arbeit die Organspezifität mit Hilfe einer neuen Methode zu quantifizieren. Darüberhinaus sollte dessen Ursache näher untersucht werden. Die Frage nach der Organspezifität des AAC in den verschiedenen Organen konnte mit den in Kapitel 3.1.1. beschriebenen Ergebnissen des dafür entwickelten quantitativen RIA-Immunoblots erneut bestätigt werden. Dabei wurden die Resultate, die mit Hilfe von immunopräzipitierenden polyklonalen Antikörpern erhalten wurden, von einigen Artefakten befreit. Diese können den immunologischen Nachweis beeinträchtigen oder stören. Dazu gehört die geringe Reinheit der AAC-Antigene aus Kalbsleber- und Rindernieren-Mitochondrien. Durch die Abtrennung von aggregiertem Protein wurde ebenfalls eine bessere Reaktion von AAC-spezifischen Antikörpern ermöglicht. Zusätzlich verbessert die gute Zugänglichkeit aller Epitope des ADP/ATP Carriers nach seiner Bindung an das Nitrozellulosepapier den immunologischen Nachweis. Der Einfluß von konformationsabhängigen Epitopen auf die Organspezifität kann mit Hilfe dieser Methode auch weitgehend ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse, die man mit Hilfe dieser Methode erhalten kann, stimmen im Bereich der Meßgenauigkeit, mit den aus der Literatur bekannten Resultaten überein. Durch Verwendung eines identischen, gefärbten Gels werden Unterschiede in der Probenzusammensetzung automatisch korrigiert und nur mit Hilfe der spezifischen Antikörper, die am monomeren AAC nachweisbare Kreuzreaktivität gemessen.

Um eine sequenzabhängige Kreuzreaktivität innerhalb der homologen Carrierproteine von einer maskierenden Cardiolipin-Kreuzreaktivität unterscheiden zu können, sind geeignete sequenzabhängige mAk erforderlich. Die Kreuzreaktivität zwischen Rinderherz-AAC und Rinderherz-Phosphatcarrier könnte z. T. dadurch erklärt werden, daß Antikörper gegen Rinderherz-Phosphatcarrier als Verunreinigung der -AAC-Präparation gebildet werden. Um diese Erklärung zu widerlegen, wurden alle SDS-denaturierten Antigene hochrein durch Elektroelution hergestellt. Da diese ähnlich wie die Antikörper gegen die nativen Carrier-Antigene reagieren, kommen wir zu dem Schluß, daß kein Einfluß durch "kontaminierende Antikörper" vorliegt. Es ist hingegen wahrscheinlicher, daß diese Kreuzreaktivität durch maskierende Einflüsse des gebundenen Cardiolipins und durch sequenzabhängige Kreuzreaktivität verursacht wird.

Es gibt somit Hinweise für eine Kreuzreaktivität auf Sequenzebene innerhalb der Carrier-Familie, zu der AAC, PiC und UCP gehören. SDS-AAC, SDS-PiC und SDS-UCP zeigen im ELISA zusätzlich aber auch noch eine Kreuzreaktivität zu Cardiolipin, die mit geeigneten polyklonalen Antikörpern nachgewiesen werden konnte. In der Literatur sind bisher keine Hinweise auf eine immunologisch nachweisbare Kreuzreaktivität zwischen dem ADP/ATP Carrier und dem Phosphatcarrier (Wohlrab et al. 1986) sowie zwischen dem AAC und dem UCP (Henningfield et al. 1987) veröffentlicht worden. In diesem Zusammenhang soll aber nicht unerwähnt bleiben, daß bis jetzt noch keine immunologisch nachweisbare Kreuzreaktivität zwischen dem AAC und dem Phosphatcarrier (Wohlrab et al. 1986) sowie zwischen dem AAC und dem UCP (Henningfield et al. 1987) nachgewiesen werden konnte.

4.2. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen den AAC

Der Gebrauch von monoklonalen Antikörpern als Hilfsmittel zur immunologischen Aufklärung der Topologie von Proteinen hat in den letzten Jahren allgemein deutlich zugenommen. Als Beispiel dafür soll nur der Laktosecarrier erwähnt werden. Die Struktur, Hydrophobizität und Funktion dieses gut untersuchten Proteins in der E. coli Membran lassen einige Analogschlüsse zum ADP/ATP Carrier zu (Carrasco et al. 1982). Die Arbeitsgruppe von Kaback (1986) konnte einen monoklonalen Antikörper der IgG-Klasse isolieren, der den Laktosetransport zu 80% hemmt. Dabei übt dieser Antikörper seine hemmende Wirkung auch als Fab-Fragment aus. Dies führt wahrscheinlich zu einer Deprotonierung dieses Carriers oder zu einer Veränderung des Gleichgewicht zwischen den protonierten und den nichtprotonierten Zuständen des Laktose-Carriers. Da es somit bereits gelang Antikörper mit funktionell hemmender Aktivität gegen ein Transportprotein zu klonieren, erhofften wir uns aus diesem Ansatz eine Beantwortung einiger Fragen zur Topologie des ADP/ATP-Carriers.

Aufgrund der Bildung von polyklonalen Antikörpern gegen Rinderherz-CAT-AAC mit funktionell hemmender Aktivität ist es wahrscheinlich, daß die native Struktur des Translokators während der Bildung der Immunantwort erhalten geblieben ist. Die Aussagen zur Topologie des intakten ADP/ATP Carriers aus Rinderherzmitochondrien mit Hilfe von sequenzabhängigen monoklonalen Antikörpern erhalten durch die gleichfalls selektierten monoklonalen Antikörper eine größere Glaubwürdigkeit. Man kann vermuten, daß bei der Bildung von funktionsspezifischen Antikörpern der Inhibitor Carboxyatraktylat nicht mehr am Nukleotidcarrier bindet.

Nach der Meinung von Atassi et al. (1977, 1978, 1981) hat auch vollständiges Freund'sches Adjuvans einen Einfluß auf die Stimulierung der Autoimmunantwort. Am Beispiel des tolerogenen Albumins fand er, daß Injektionen von Albumin mit Freund'schem

Adjuvans zur Bildung von Autoantikörpern führt. Da er denaturierende Einflüsse dieses Adjuvans ausschließen konnte, führte er dieses Ergebnis auf Autoepitope auf der Oberfläche des Mycobacterium tuberculosis zurück. Dieses ist ein Bestandteil des vollständigen Freund'schen Adjuvans. Seiner Meinung nach können diese Antikörper durch einen, noch nicht verstandenen Mechanismus gebildet werden, der zur Aufhebung der T-Zelltoleranz führt (Atassi et al. 1980). Diese können in pathologischen Fällen durch einen bisher kaum verstandenen Mechanismus ausgelöst werden, der zur Aufhebung der T-Zelltoleranz führt (Atassi et al. 1980). Experimentell könnte dabei das vollständige Freund'sche Adjuvans durch Umgehung der T-Zell-Suppression eine Rolle spielen (Atassi et al. 1970, Allison et al. 1976). Diese Interpretation des Einflusses dieses Adjuvans als Immunsierungsartefakt ist nach unserer Meinung von geringerer Bedeutung.

Ein Nachteil bei der Verwendung des SDS-AAC als Testantigen besteht darin, daß dieses Protein auch nach der Reinigung in SDS immer noch fest gebundenes Cardiolipin trägt. Dies ist bei der Selektion von monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlicher Sequenzspezifität nicht erwünscht. Eine quantitative Entfernung des gebundenen Cardiolipins ist ohne eine Schädigung des Proteins kaum möglich.

Der SDS-denaturierte Rinderherz-AAC läßt sich im Gegensatz zum -UCP leider nicht erfolgversprechend in kleinere, gut charakterisierte natürliche Peptide spalten. Dies beeinträchtigt sowohl die Auswahl der immunisierten Mäuse, als auch die Selektion der Hybridomaklone nach sequenzspezifischen Antikörpern unterschiedlicher Spezifität.

Bei der Selektion der funktionell hemmenden Antikörper zeigte sich, daß das sehr empfindliche DAN-AMP Fluoreszenz-Testsystem vor allem anfällig gegenüber dem foetalen Rinderserum ist. Dies wird als Mediumzusatz zum Wachstum der empfindlichen Hybridomaklone benötigt. Der anfängliche Test der polyklonalen Antikörper der Mäuse war wegen der geringen Spuren an Serumalbumin mit einem Anteil von 0,015% im Meßansatz davon nicht betroffen. Der Gehalt an 0,6% Albumin in einem Meßansatz mit monoklonalen Antikörpern aus Kulturüberständen zeigte, daß dieses DAN-AMP binden kann. In abgeschwächter Form wird nach Zugabe von Bonkregat ein Abfall der

Fluoreszenz beobachtet. Dies erklärt sich aus dem hydrophoben Bindungscharakter des Albumins. Da aber der Übergang des AAC vom matrix- in den cytosolischen Zustand durch Bindung von CAT nach Zugabe von ADP und BKA selbst nicht gestört wird, konnte dieses Testsystem weiterhin verwendet werden. Zusätzlich wurden die selektierten Antikörper aber durch Hemmung des Nukleotidtransportes am rekonstituierten AAC auf funktionell hemmende Aktivität getestet. Dabei stört Albumin nicht. Um gut quantifizierbare Aussagen mit Hilfe dieses Testsystems zu bekommen, wurde der Nukleotid-Austausch nach 10 Sekunden, am Ende des linearen Teils der Transportrate, gestoppt. Für die funktionellen Tests wurden 0,2-0,6 μ l verdünntes Antiserum benötigt. Dies entspricht einem geschätzten Verhältnis Antigen : Antikörper von 1 : 1 bei einem Anteil des aktiven AAC von maximal 7%. Ein Einsatz wesentlich größerer Mengen an Serum kann zu Störungen der Vesikeldichtigkeit und somit zu scheinbaren Hemmungen des Transportes führen. Eine mögliche Ursache dafür könnte neben einem osmotischen Ungleichgewicht durch den hohen Anteil an Serum ein Einfluß der darin enthaltenen Lipoproteine auf die Stabilität der Vesikel sein. Um diesen Einfluß gering zu halten, wurden für jede Messung ca. 1 μ g an polyklonalen Antikörpern eingesetzt. Die Inkubationszeit des Antikörpers mit den Proteoliposomen wurde deshalb auf eine Stunde begrenzt. Das Fluoreszenz Testsystem, in welchem die Dichtigkeit der Liposomen nicht maßgebend für die Aussagekraft der Testergebnisse ist, läßt eine Inkubation der Antikörper über Nacht zu. Um die Reaktivität der Antikörper am funktionell aktiven AAC zu ermöglichen, wurde der Tritongehalt des Proteins bis auf ein Verhältnis Detergenz : Protein von minimal 3,5 reduziert. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, daß das Protein nach Rekonstitution, wesentlich länger vor dem Einfluß von Proteasen geschützt wird. Dies war auch der Grund dafür, auf die Verwendung von solubilisiertem AAC als funktionellem Testsystem zu verzichten. Das Bindungsverhalten der Antikörper führt zu dem Schluß, daß diese am rekonstituierten AAC im matrix-Zustand auf der cytosolischen Seite binden. Der sehr geringe Tritongehalt der Proteoliposomen ist auch der Grund dafür, daß im Fluoreszenz-Testsystem auch schwach affine Antikörper binden können. Dies zeigt sich in seiner etwa 5-fach höheren Empfindlichkeit gegenüber dem Nukleotidaus-

tausch-Testsystem. Bei den Messungen stellte man neben einer Hemmung des m-,c- Überganges nach der Reaktion der polyklonalen Antikörper einen zweiten Effekt fest. Dabei wird der Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von DAN-AMP unter Einwirkung funktionsspezifischen pAk deutlich reduziert. Dieser Effekt allein korreliert kaum mit den Austauschmessungen. Deshalb kam er nur unter Berücksichtigung der Hemmung des m-, c- Überganges nach Zugabe von ADP und CAT in Betracht. Monoklonale Antikörper zeigten dagegen eine Hemmung des Überganges vom matrix- in den cytosolischen Zustand, aber keine Hemmung des Fluoreszenzanstieges nach Bindung von DAN-AMP. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß wahrscheinlich zwei verschiedene, funktionell hemmende Antikörper gegen CAT-AAC gebildet werden.

Leider gelang es aber nur einen funktionsspezifischen Hybridomaklon zu isolieren, der Antikörper produziert, die den m-, c- Übergang hemmen.

Die unter 3.2.3. erwähnten Ergebnisse zeigten, daß ein monoklonaler Antikörper (7G11-A1) mit Rinderherz-CAT-AAC reagiert und den Austausch von ^{14}C -ATP mit ca. 50% hemmt. Da dieses Protein in der Phospholipidmembran mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 50% im nichtenergetisierten Zustand mit seiner matrix-Seite nach außen eingebaut wird (Krämer et al. 1981), kann man erwarten, daß der funktionell hemmende monoklonale Antikörper nur in diesem Konformationszustand mit dem AAC reagiert.

Wegen der Neigung des monoklonalen Antikörpers der IgM-Klasse zu Präzipitation und Unspezifität wurde die Fähigkeit eines ausgewählten Hybridomaklones, spontan IgG mit gleicher Bindungsspezifität zu produzieren, genutzt. Diese von Sablitzky et al. (1982) beschriebene Eigenschaft aller Hybridomaklone tritt normalerweise mit einer Wahrscheinlichkeit von $1 : 10^7$ auf. Da der für diese Arbeiten ausgewählte Subklon von 7G11-A1- bereits geringe Mengen an spezifischem IgG produzierte, gelang es, die entsprechenden IgG-produzierenden Hybridomazellen zu isolieren.

Die Interpretation der Testergebnisse hinsichtlich ihrer Spezifität wird durch eine Kreuzreaktion des ADP/ATP Carriers z. B. mit dem HIV-Virus erschwert. Ein monoklonaler Antikörper der IgM-Klasse der gegen das HIV-Antigen selektiert worden war, zeigte ebenfalls eine sehr starke immunologisch nachweisbare Reaktion mit CAT-AAC. Eine Erklärung für das Bindungsverhalten dieser IgM-Antikörper mit Cardiolipin, aber auch mit DNS, könnte auch in den physikalischen Eigenschaften des Antigens liegen. Diese Eigenschaften können monoklonale IgM-Antikörper veranlassen, mit diesem Antigen zu reagieren.

Haptene wie z.B. die Trinitrophenyl-Gruppe zeigen ebenfalls eine Reaktivität für monoklonale IgM-Antikörper. Dieses ist im B-Zell-Repertoire häufiger als hydrophile immunologische Determinanten vertreten (Pisetzky et al. 1982, Klinman et al. 1977 und Kilsoe et al. 1986). Die gleichzeitige Belegung von zwei oder mehr Antigenbindungsstellen an diesem pentameren Antikörpermolekül durch ein Antigen mit vielen Epitopen ermöglicht selbst dann eine nachweisbare Reaktion, wenn die jeweilige Affinität jeder individuellen Bindungsstelle am IgM-Antikörper niedrig ist (Steward et al. 1985, Gosh et al. 1986).

Mit Hilfe eines kompetitiven ELISA konnte in 3.2.6. gezeigt werden, daß der monoklonale IgG₁-Antikörper 13D4, eine Spezifität für Cardiolipin zeigt. Dieser Antikörper reagiert daher besonders deutlich mit dem Rinderherz-AAC. Diese Organspezifität kann durch einen unterschiedlichen Anteil fest gebundenen Cardiolipins an diesen Antigenen erklärt werden. Arbeiten von Suske et al. (1987) und Schlerf et al. (1988) hingegen erklären am Beispiel von Unter-einheit IX der Rinderherz-Cytochrom-Oxidase die Gewebsspezifität durch Sequenzunterschiede am Amino-Terminus dieses Proteins. Kürzlich gelang es der Arbeitsgruppe von Giusti (1987) in einer immungenetischen Arbeit die Ursache für die Spezifitätsunterschiede in der Erkennungsregion zwischen einem Phosphatidylcholin-spezifischen und einem DNS- bzw. Cardiolipin-spezifischen Antikörper aufzuklären. In Position 35 der schweren Kette der hypervariablen Region bei Antikörpern mit einer Spezifität für Phosphatidylcholin wird eine Glutaminsäure nachgewiesen. Die Antikörper mit DNS- bzw. Cardiolipin-Spezifität hingegen haben an dieser Stelle in der Sequenz ein Alanin. Das Auftreten der Glutaminsäure bei Phosphatidylcholin-spezifischen monoklonalen Antikörpern spielt nach der Meinung von Padlan et al. (1985) über elektrostatische und konformationsabhängige Einflüsse eine wichtige Rolle bei der Reaktion der Antikörper mit Phosphatidylcholin. Die Zellen der Myelomalinie S 107, die

ebenfalls zu somatischer Mutation neigt, sind wie bereits erwähnt möglicherweise in allen Stadien der B-Zelldifferenzierung aktiv. Davidson et al. (1986) hatten im Serum von MRL/lpr und Balb/c Mäusen DNS-Antikörper des T-15 Idiotyps nachgewiesen. Dieses Ergebnis erklärt, weshalb wir in vielen Normalseren von Balb/c Mäusen Antikörper mit einer Kreuzreaktivität zu Rinderherz-CAT-AAC nachweisen konnten (siehe Anhang, Pos. 9). Antikörper gegen den T-15 Idiotyp können die Immunantwort gegen das dominierende Epitop in der Zellwand des Erregers *Streptococcus pneumoniae*, das Phosphatidylcholin, inhibieren. Dieser T-15 Idiotyp kommt in den Tumoren TEPC-15, HOCP-8 und S-107 vor. Er stellt den wichtigsten Idiotyp der IgM-Immunantwort gegen Phosphatidylcholin dar. Blaser et al. (1984) konnten zeigen, daß sich der Anteil T-15-spezifischer Antikörper der IgM-Klasse im erfassten Zeitraum von 20 Wochen kaum verändert. Diese enge Verwandtschaft zwischen dem Cardiolipin-, Phosphatidylcholin-spezifischen Antikörpern und den DNS-reaktiven Autoantikörpern könnte den Zusammenhang zwischen der Organspezifität und dem autoantigenen V Charakter des AAC besser erklären als ein Autoepitop am ADP/ATP Carrier.

Bei dieser Gelegenheit soll noch auf einige Arbeiten hingewiesen werden, die sich mit der Bildung von DNS-reaktiven Autoantikörpern beschäftigten. Nach einer Arbeit von Mendlovic et al. (1988) führt ein antiidiotypischer monoklonaler Antikörper 16/6 der IgM-Klasse zum systematischen Lupus erythematodes, einer schon seit langer Zeit bekannten Autoimmunerkrankung. Hierbei treten während der Induktionsphase Antikörper gegen DNS und gegen Ribonukleoproteine auf. F₁-Mäuse (C56/BL6 x Balb/c) entwickeln in kurzer Zeit Autoantikörper, die in ihrer Spezifität den genannten ähneln (Luzuy et al. 1986). Ergebnisse der Arbeiten von Stott et al. (1988) deuten darauf hin, daß für die Entwicklung der Autoimmunantwort T-Helferzellen mit ähnlichen Merkmalen wie beim systemischen Lupus erythematodes erforderlich sind. Die polyklonale Aktivierung dieser Zellen erfordert neben den genetischen Unterschieden im Haupt-Histokompatibilitätskomplex II noch ein zweites Signal, das durch Bindung der B-Zellrezeptoren an DNS, Chromatin toter Zellen oder durch ein kreuzreagierendes Antigen ausgelöst wird.

Die Bedeutung des AAC als mitochondriales Autoantigen ist von geringerer Bedeutung als bisher dargestellt. Neben den bereits anfangs erwähnten Autoren wiesen noch Morgan-Hughes et al. (1986) und Capaldi et al. (1988) auf eine Reihe von alternativen Autoantigenen hin, die für die Kardiomyopathie und für viele weitere Autoimmunerkrankungen in Frage kommen. Als mögliche weitere Autoantigene wären in diesem Zusammenhang Multienzymkomplexe der Atmungskette, wie NADH-Ubichinon-Reduktase, Cytochrom b und Cytochrom c-Oxidase besonders zu erwähnen. In Zusammenarbeit mit Frau Ocampo-Ehrler (unveröffentlicht) konnte mit Hilfe von ausgewählten Patientenseren ebenfalls eine Spezifität dieser Antikörper für Cardiolipin am CAT-AAC und SDS-AAC nachgewiesen werden. Daneben zeigten Tests der humanen Antikörper im Immunoblot eine Spezifität einiger Antikörper für Autoantigene im Molekulargewichtsbereich um 50 kD und 70 kD. Es ist wahrscheinlich, daß diese Antikörper, wie einleitend erwähnt, eine Spezifität für Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase besitzen. Ähnliches wird von Kyriat-soulis et al. (1988) bei mitochondrialen Antikörpern beschrieben, die von Patienten stammten, die an primärer biliärer Cirrhose erkrankt waren. Die Ergebnisse unserer Arbeiten zur Spezifität der mexikanischen Patientenseren sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst. Abbildung 29 veranschaulicht zusätzlich das Bindungsverhalten einiger ausgewählter humaner Antikörper im Immunoblot an mitochondrialen Rinderherz-Extrakten. Dabei zeigte der polyklonale Antikörper 2.9. eine Spezifität für den Rinderherz-AAC und -PiC im Immunoblot. Man sollte aber an dieser Stelle auf die Schwierigkeiten hinweisen, die durch die Verwendung von lyophilisierten Antiseren für die Optimierung der Testsysteme entstanden. Um besser abgesicherte Aussagen machen zu können, wäre eine größere Anzahl an Patientenseren notwendig, vor allem um interessante funktionelle Aspekte dieser Autoantikörper im Zusammenhang mit dem AAC zu überprüfen.

Der monoklonale Antikörper 5B8 zeigt in 3.2.7. eine Reaktion mit dem SDS-AAC, aber nicht mit dem nativen CAT-AAC. Weiterführende Versuche an SDS-UCP zeigten eine immunologisch nachweisbare Reaktion dieses monoklonalen Antikörpers. Vergleiche der Primärstruktur des AAC ergaben eine Ähnlichkeit in der Sequenz zwischen Position 188-204 beim Rinderherz-Nukleotidcarrier. Die Positi-

on 88-95 in der Sequenz des UCP ist mit dem AAC und dem tryptischen Peptid der λ_3 -Kette vergleichbar. Die Sequenzen der humanen λ_1 und λ_3 -Ketten, sowie in den ebenfalls kreuzreagierenden κ_2 und κ_3 -Ketten zeigen untereinander in dem interessierenden tryptischen Peptid eine sehr große Ähnlichkeit. Da dieser kreuzreagierende monoklonale Antikörper nicht mit CAT-AAC reagiert, kommt man zu dem Schluß, daß das dafür verantwortliche Epitop am nativen AAC in diesem Zustand im ELISA nicht zugänglich ist. Dies schließt auch eine unspezifische immunologische Reaktion dieses Antikörpers aus. Der monoklonale Antikörper 5B8 zeigt ebenfalls eine Kreuzreaktivität mit dem SDS-PiC. Dieses Bindungsverhalten weist auf eine deutliche Ähnlichkeit mit einem kreuzreagierendem Epitop zwischen den homologen Carrierantigenen AAC, UCP und PiC hin

Tabelle 6 Zusammenfassung der mit Hilfe des indirekten ELISA bei 455 nm gegen CAT-AAC, SDS-AAC und Cardioli-pin ermittelten Extinktionswerte im ELISA. - Ak-Verdünnung 1 : 12000. Die angegebenen Werte entsprechen den Extinktionswerten des Substrates bei 455 nm.

Nr.	Serum-Nr.	CAT-AAC	SDS-AAC	Cardiolipin	Ergebnis
<u>Serie 1</u>					
1		0,101	0,369		-
2	111343	0,278	0,332		(+)
3	138763	0,308	0,507	0,537	+
4	152064	0,304	0,735	0,454	+
5	189109	0,344	0,349		(+)
6	191248	0,163	0,223		-
7	197920	0,162	0,254		-
8	201398	0,405	0,573	0,721	+
9	206258	0,065	0,115		-
10	206667	0,218	0,337		(+)
11	206814	0,522	0,476		+
12	206845	0,310	0,324		(+)
13	206872	0,392	0,881	0,557	+
14	206902	0,209	0,438	0,436	(+)
15	206903	0,213	0,643	0,508	+
<u>Serie 2</u>					
1	192238	0,129	0,151		-
2	196843	0,121	0,209	0,278	-
3	198422	0,054	0,034		-
4	201006	0,062	0,129		-
5	204818	0,072	0,154		-
6	205179	0,533	0,246		(+)
7	205405	0,211	0,265	0,523	(+)
8	205227	0,111	0,161	0,196	-
9	205408	0,226	0,598	0,365	(+)
10	205539	0,053	0,009		

-Kontrolle		0,039	0,110	0,122	-
		0,063	0,169	0,145	
		0,032	0,054		
		0,040	0,049		
		0,045	0,103		

Positive Ergebnisse: mehr als 4-fach -Kontrolle

Tabelle 7 Zusammenfassung der ELISA Testergebnisse und Immunoblots mit den mexikanischen Patientenserum gegen CAT-AAC, SDS-AAC, Cardiolipin, sowie gegen mitochondriale Rinderherzextrakte. Ak-Verdünnung 1 : 1200. Die angegebenen Meßwerte entsprechen den Extinktionswerten des umgesetzten Substrates bei 455 nm.

Nr.	Serum Nr.	CAT-AAC		SDS-AAC		Cardiolipin		I-Blot	Ergebnis
	<u>Serie 1</u>	-Cl	+Cl	-Cl	+Cl	-Cl	+Cl		
1	-	0,101	0,086	0,058	0,048	0,101	0,086		-
2	111343	0,278	0,161	0,367	0,133	0,278	0,161	AAC/PiC	(+)
3	138763	0,308	0,157	0,156	0,063	0,308	0,157	AAC/PiC	(+)
4	152064	0,304	0,211	0,152	0,133	0,304	0,211	AAC/PiC	(+)
5	189109	0,344	0,188	0,325	0,082	0,344	0,188		+
6	191248	0,163	0,082	0,496	0,083	0,163	0,082	AAC/PiC	(+)
7	197920	0,162	0,079	0,221	0,055	0,162	0,079	AAC/70kD	(+)*
8	201398	0,405	0,212	0,274	0,121	0,405	0,211	AAC/70kD	+
9	206258	0,065	0,041	0,103	0,046	0,065	0,041		-
10	206667	0,218	0,065	0,198	0,089	0,218	0,065		-
11	206814	0,522	0,075	0,413	0,129	0,522	0,075	AAC/PiC	+
12	206845	0,310	0,136	0,222	0,097	0,322	0,136	AAC/PiC	+
13	206872	0,392	0,242	0,212	0,212	0,392	0,242	AAC/PiC	(+)
14	206902	0,209	0,350	0,223	0,183	0,209	0,350	AAC/45kD	(+)*
15	206903	0,285	0,225	0,245	0,088	0,213	0,225	AAC/PiC	(+)
	<u>Serie 2</u>								
1	192238	0,119	0,061	0,067	0,049	0,119	0,061		-
2	196843	0,166	0,065	0,079	0,050	0,166	0,065		-
3	198422	0,062	0,028	0,048	0,049	0,062	0,028		-
4	201006	0,074	0,113	0,046	0,070	0,074	0,113		-
5	204818	0,116	0,047	0,095	0,050	0,116	0,047		-
6	205179	0,093	0,054	0,156	0,160	0,093	0,054		-
7	205405	0,156	0,064	0,144	0,067	0,156	0,064	AAC/70kD	*,*
8	205227	0,082	0,037	0,014	0,042	0,082	0,063		-
9	205498	0,285	0,112	0,500	0,097	0,285	0,112	AAC/PiC	+
10	205539	0,051	0,033	0,031	0,035	0,051	0,033		-

-K		0,044	0,030	0,025	0,019	0,035	0,027		
		0,038	0,042	0,019	0,020	0,038	0,037		
		0,038	0,024	0,009	0,012	0,037	0,032		
				0,049	0,014	0,034	0,020		

* im Immunoblot positiv, im ELISA negativ.

Positive Ergebnisse: mehr als 4-fach -Kontrolle.

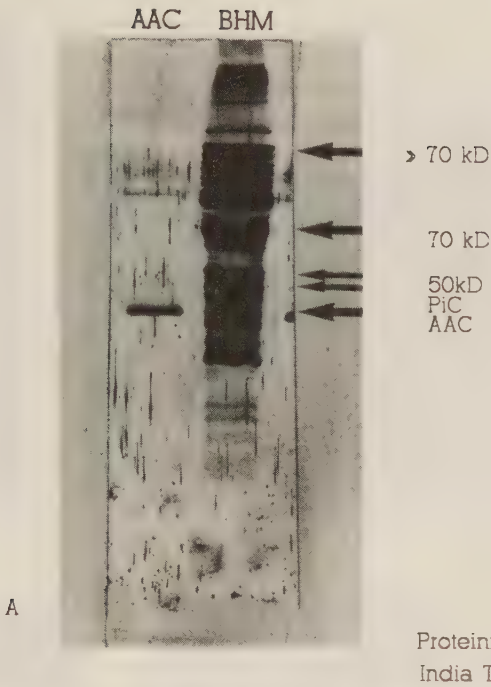


Abb. 28 Bestimmung der Bindungsspezifität der mexikanischen Patientenserum durch Immunpräzipitation an mitochondrialen Rinderherzextrakten. 5 μ g AAC und 20 μ g Mitochondrienextrakt wurden je auf eine Tasche eines kleinen 0,75 mm dicken 12% Laemmli-Gels aufgetragen und 75' bei 200 V transferiert.

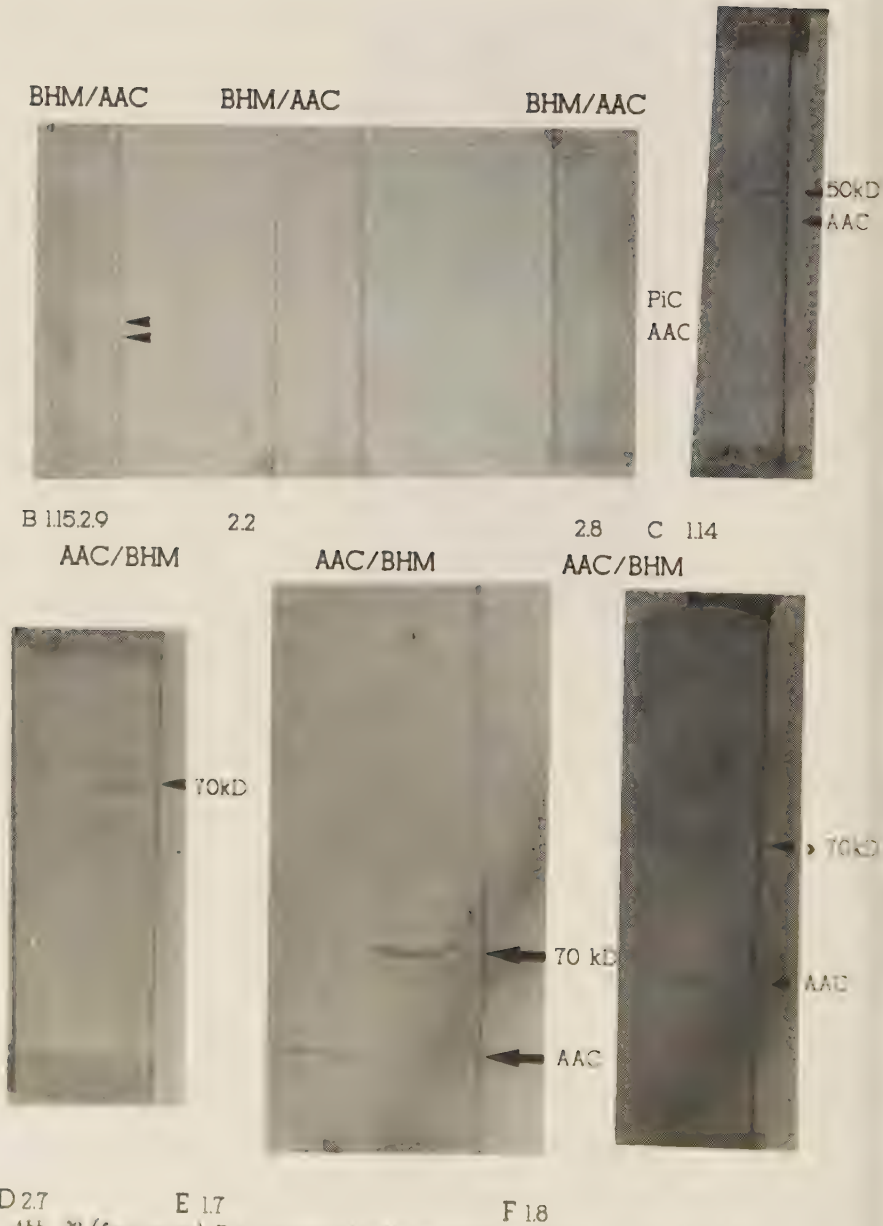


Abb. 29 (fortgesetzt) Die ultrazentrifugierten Patientenseren wurden in 0.12 lipidfreiem BSA/PBS + 0.007% Tween 20 1:2500 verdünnt und 1 h auf Nitrozellulosepapier inkubiert.

4.3. Monoklonale Antikörper gegen SDS-UCP

Wie in Kapitel 3.3. bereits erwähnt, konnte die Reaktion der ausgewählten monoklonalen Antikörper mit SDS-UCP im Gegensatz zu den polyklonalen Antikörpern gleicher Spezifität auf Nitrozellulosepapier nicht immunologisch nachgewiesen werden. Dies war der Grund für uns nach der Ursache für dieses Problem zu suchen. Dabei stellten wir fest, daß die Bildung von -S-S- Bindungen am Uncoupling Protein zu einer Änderung der Konformation des SDS-UCP führt. Diese bewirkt, daß die gegen SDS-UCP selektierten monoklonalen Antikörper nicht mehr auf dem immobilisierten UCP an Nitrozellulosepapier binden können. Im Gegensatz dazu reagiert SDS-UCP auf den mit poly-L-Lysin beschichteten ELISA-Testplatten. Eine Beeinträchtigung der Reaktion von SDS-UCP-mAk mit dem immobilisierten SDS-UCP konnte aber auch in diesem Testsystem beobachtet werden. Acht bis zwölf Wochen nach der Beschichtung mit SDS-UCP verzögert sich die Substratreaktion ca. um das vierfache. Die wahrscheinlich auf Konformations-Einflüsse zurückzuführenden Probleme bei der Reaktion der gegen SDS-UCP gerichteten monoklonalen Antikörper werden noch durch ELISA-Titrationsversuche mit polyklonalen Antikörpern gegen SDS-UCP bestätigt. Falls reduzierende Bedingungen während des gesamten Tests verwendet werden, zeigt sich sowohl eine deutliche Steigerung der Absorption als auch ein drastischer Anstieg der Bindungstitel von 1 : 7000 auf 1 : 3×10^6 um 10 Titerstufen. Dabei zeigte sich sowohl eine deutliche Steigerung der Absorption als auch ein drastischer Anstieg der Bindungstitel von 1 : 7000 auf 1 : 3×10^6 um 10 Titerstufen, falls reduzierende Bedingungen während des gesamten Tests verwendet werden.

4.4. Ausblick auf künftige Arbeiten

Die Organspezifität konnte in der vorliegenden Arbeit erneut bestätigt werden. Die Ergebnisse des Bindungsverhaltens der poly- und monoklonalen Cardiolipin-spezifischen Antikörper im Immunoblot führen aber dazu, daß diese Hypothese hinsichtlich der Cardiolipin-Kreuzreaktivität modifiziert werden muß. Noch ausstehende Arbeiten mit spezifischen Rattenleber-AAC- und Rindernieren-AAC-Antikörpern haben eine bessere Charakterisierung des Cardiolipin-Anteil an der Kreuzreaktivität der Primärstruktur dieser homologen Proteine zum Ziel. Eine genaue Kartierung der Lage der Epitope auf der Oberfläche des ADP/ATP

Carriers steht ebenfalls noch aus. Dies wird mit demnächst verfügbaren synthetischen Rinderherz-AAC-Peptiden versucht werden. Die Bedeutung dieser Epitope im Zusammenhang mit einer Kreuzreaktivität zwischen dem AAC und dem Uncoupling Protein ist Gegenstand weiterer Arbeiten.

Ergebnisse von Schultheiß et al. (unveröffentlicht) zeigen eine Kreuzreaktivität des AAC mit dem Connexon und dem Calcium-Kanal. Eine mögliche Erklärung dafür und für die von uns festgestellte Kreuzreaktivität mit dem UCP fehlt z. Zt. noch. Eine mögliche Erklärung für die Kreuzreaktivität des AAC mit dem HIV-Antigen, dem Connexon und dem Calcium-Kanal könnte in einer Kreuzreaktivität des phosphorylierten Serins am Connexon (Traub et al. 1987) bzw. phosphoryliertes Serin und Threonin am Calcium-Kanal (O' Callahan et al. 1988) bzw. phosphorylierte Glycoproteine auf der Oberfläche des HIV-Virus sein (Fields et al. 1988). Genauere kompetitive Bindungsstudien dazu stehen aber noch aus.

Zuletzt bietet sich noch eine genauere Charakterisierung der Lage von immunologischen Determinanten auf der Oberfläche des Rinderherz-PiC an. Dazu sollten monospezifische Antikörper gegen geeignete natürliche Peptide verwendet werden. Diese Arbeiten sollten die Homologie dieser Transportprotein-Familie bestätigen, zu der auch der AAC und das UCP gehören.

5. Zusammenfassung

Das Thema dieser Arbeit behandelt die immunologische Charakterisierung des ADP/ATP Carriers mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern.

Hierbei wurden folgende Teilfragen beantwortet:

- I. Selektion von monoklonalen Antikörpern zur immunologischen Charakterisierung des AAC und seiner Sequenzhomologie zum Phosphatcarrier.
 - II. Nachweis der Organspezifität des AAC mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen Rinderherz-AAC.
 - III. Monoklonale Antikörper gegen das mit dem AAC verwandte Uncoupling Protein und Untersuchungen der Kreuzreaktivität mit dem homologen AAC.
 - IV. Experimente zum Bindungsverhalten humaner Kardiomyopathieseren am AAC.
- I. Selektion von monoklonalen Antikörpern zur immunologischen Charakterisierung des AAC und seiner Sequenzhomologie zum Phosphatcarrier.

Die monoklonalen Antikörper wurden gegen die intakte Form des AAC (CAT-AAC), sowie gegen die denaturierte Form des AAC (SDS-AAC) gebildet.

- I.) Die Selektion auf der Stufe der polyklonalen Antikörper in Mäusen, erfolgte über die immunologische Reaktivität und über die Hemmung der Transportfunktion. Als Testsystem für die funktionelle Hemmung wurde AAC in rekonstituierter Form benutzt. Das Tier, das polyklonale Antikörper mit der höchsten Reaktivität in beiden Testsystemen produziert, wurde für die Fusion verwendet. Der Nukleotidaustausch wird durch die polyklonalen Antikörper der ausgewählten Maus 26 bis 100% gehemmt. Zur Selektion der funktionell hemmenden Hybridomaklone nach den Klonierungen benutzten wir zur Detektion das DAN-AMP-Fluoreszenz Testsystem. Dabei wird die Hemmung des

m-, c- Überganges am AAC durch funktionell hemmende Antikörper geprüft.

Folgende, fünf verschiedene Typen monoklonaler Antikörper erhielten wir aus der CAT-AAC-Fusion..

- A) CAT-AAC-spezifische Antikörper, die den Austausch mit max. 50% hemmen (7G11).
- B) Monoklonale Antikörper, die mit CAT-AAC reagieren und im Immunoblot eine Kreuzreaktivität zum PiC zeigen. Diese Antikörper sind Cardiolipin-spezifisch und zeigen keine funktionell hemmende Aktivität.
- C) SDS-AAC-spezifische, sequenzabhängige Antikörper (6A10, 7H2).
- D) Sequenzabhängige SDS-AAC-Antikörper, die mit dem Phosphat-carrier kreuzreagieren (7F4, 2H12, 4A11, 6H9).
- E) Ein kreuzreagierender SDS-AAC-Antikörper (2A6), der ebenfalls den PiC im Immunoblot erkennt. Er reagiert aber zusätzlich noch mit dem CAT-AAC im ELISA.

Die Antikörper vom Typ D werden in ihrer Reaktion mit SDS-AAC durch Antikörper vom Typ C kompetitiv nicht gehemmt.

Im Gegensatz dazu verdrängen Antikörper vom Typ C kompetitiv jene vom Typ E. - Dies bedeutet, daß Antikörper vom Typ E mit dem gleichen Epitop wie Antikörper vom Typ C reagieren. Sie unterscheiden sich darin voneinander, daß der Typ E vermutlich zusätzlich noch fest gebundenes, kreuzreagierendes Cardiolipin erkennen kann.

- 2.) Die mit SDS-AAC immunisierten Mäuse wurden für die Vorauswahl zur Fusion nach der Reaktivität für SDS-AAC und kombinierter Reaktivität für SDS-AAC und CAT-AAC unterschieden.

Die Selektion der Hybridomaklone dieser Fusion erfolgte gegen SDS-AAC und lyophilisierten AAC mit Hilfe des ELISA. Die daraus erhaltenen Antikörper zeigten alle eine Kreuzreaktivität zum Phosphatcarrier. Diese war vergleichbar mit der Reaktion der Antikörper vom Typ D (11G1, 13B3, 16D12, 3F3, 5H6) und Typ E (14G5) der CAT-AAC-Fusion.

Das Säurespaltstück A1 des Rinderherz-AAC reagiert mit den ausgewählten Antikörpern beider Fusionen (6A10 und 13 B3).

II. Nachweis der Organspezifität des AAC mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen Rinderherz-AAC.

Die Organspezifität, vorzugsweise für Herz-AAC wird durch die Ergebnisse des quantitativen RIA-Immunoblots bestätigt. Dabei zeigte sich, daß Antikörper gegen Rinderherz-CAT-AAC mit Nieren-AAC zu 25% kreuzreagieren. Leber-AAC reagiert mit 15% im Vergleich zu Herz-AAC.

Nieren-AAC kreuzreagiert mit SDS-AAC-spezifischen Antikörpern ebenso wie Leber-AAC mit 35% der Antigenität von Herz-AAC.

Rinderherz-CAT-AAC kreuzreagiert mit polyklonalen Cardiolipin-spezifischen Antikörpern.

Der monoklonale Antikörper mit Cardiolipin-Spezifität (I3D4) erkennt im Immunoblot neben AAC noch den Phosphatcarrier aus mitochondrialen Rinderherzextrakten. Dieser monoklonale Antikörper detektiert unter den AAC-Antigenen tierischen Ursprungs spezifisch Herz-AAC. Dies ist vermutlich auf einen erhöhten Cardiolipin-Anteil an diesem Protein zurückzuführen.

III. Monoklonale Antikörper gegen das mit dem AAC verwandte Uncoupling Protein

Die mit SDS-UCP immunisierten Mäuse wurden, nach der Reaktivität in ELISA Testsystemen mit SDS-UCP und lyophilisiertem UCP als Testantigen, ausgewählt. Zusätzlich wurden die immunisierten Tiere nach dem Bindungsverhalten ihrer gegen SDS-UCP gerichteten polyklonalen Antikörper auf Cyanbromid Peptiden, unterschieden. Die nach ihrer Avidität in beiden ELISA-Testsystemen ausgewählten monoklonalen Antikörper (IH6, 9D5) kreuzreagieren im Immunoblot mit mehreren mitochondrialen Proteinen. Dabei konnte mit Hilfe des Antikörpers IH6 gezeigt werden, daß dieser spezifisch durch Vorinkubation mit SDS-UCP gehemmt wird. Die polyklonalen Antikörper dieser Fusion reagieren empfindlich auf die Bildung von -S-S-Bindungen nach Immobilisierung des SDS-UCP auf Nitrozellulosepapier.

Das Säurespaltstück A1 des Rinderherz-AAC kreuzreagiert mit dem monoklonalen Antikörper IH6.

Die Mehrzahl der gegen SDS-UCP gerichteten sequenzspezifischen monoklonalen Antikörper erkennen alle getesteten AAC-Antigene. Nur *Neurospora-crassa* reagiert nicht mit dem monoklonalen Antikörper IH6.

IV. Experimente zum Bindungsverhalten humaner Kardiomyopathie-Seren am AAC

Kardiomyopathie-Seren wurden auf ihr Bindungsverhalten mit Rinderherz-AAC untersucht. Dabei zeigten einige Antikörper eine Reaktion mit AAC und einem Protein von 35 kD Größe. Diese Antikörper reagierten im kompetitiven ELISA spezifisch mit Cardiolipin. Andere Patientenseren erkannten ein 70kD bzw. 45 kD großes Protein im Immunoblot.

Diese Hinweise bestätigten, daß Autoantikörper gegen verschiedene Antigene gerichtet sind, die bei den verschiedenen Herzerkrankungen beteiligt sind. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß Cardiolipin als kreuzreagierendes Autoantigen eine Rolle spielt.

Die charakterisierten monoklonalen Antikörper sind als Hilfsmittel zur Aufklärung der Topologie des AAC geeignet. Ihre eigentliche Bedeutung reicht aber über diese Anwendung hinaus. Mit ihrer Hilfe wird es möglich sein, weitere Fragen nach Struktur- Funktionsbeziehungen zu beantworten. Einige ausgewählte monoklonale Antikörper zeigen eine immunologisch nachweisbare Sequenzhomologie der Carrierantigene AAC/UCP/PiC. Das bisherige Wissen über die immunogenen Eigenschaften des ADP/ATP Carriers konnte mit ihrer Hilfe in einigen Punkten korrigiert bzw. erweitert werden.

6. Verzeichnis der Abkürzungen

Ag	Antigen
AMA	mitochondrialer Antikörper
ATR	Atraktlylat
BHM	Rinderherz-Mitochondrien
BKA	Bonkregat
BSA	Rinderserum-Albumin
CAT	Carboxyatraktlylat
CF	Complement fixierend
CL	Cardiolipin
DAN-AMP	1,5 Diaminoaphtyl-Adenosinmonophosphat
DAB	Diaminobenzidin
ss DBS	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F ₁	1. Filialgeneration
mAk	monoklonale Antikörper
m-, c-	matrix-, cytosolischer Zustand
MHC	Haupt-Histinkompatibilitäts-Komplex
RiN	Rinderniere
PBC	primäre biliäre Cirrhose
POD	Peroxidasekonjugat
pAk	polyklonale Antikörper
PEG	Polyethylenglycoll
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylcholin
PS	Phosphatdylserin
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SDS-AAC	SDS-denaturierter ADP/ATP Carrier
SDS-PAGE	Natrium-dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
Tricine	N-Tris (Hydroxymethyl) methylglycerin
UCM	mitochondrialer, Uncoupling Protein-haltiger Extrakt
UCP	Uncoupling Protein
VDLR-	Veneral Disease Research Laboratory
OPD	Ortho-Phenylendiamin
PiC	Phosphat-Carrier

7. Anhang

Pos. 1a Sequenz des Nukleotidcarrier-Säurespaltstücks A1

10 20
Ac-S-D-Q-A-L-S-F-L-K-D-F-L-A-G-G-V-A-A-A-I-S-K-T-A-V-
30 40 50
-A-P-I-E-R-V-K-L-L-L-Q-V-Q-H-A-S-K-Q-I-S-A-E-K-Q-Y-
60 70
-K-G-I-I-D-C-V-V-R-I-P-K-E-Q-G-F-L-S-F-W-R-G-N-L-A-
80 90 100
-N-V-I-R-Y-F-P-T-Q-A-L-N-F-A-F-K-D-K-Y-K-Q-I-F-L-G-
110 120
-C-V-D-R-H-K-Q-F-W-R-Y-F-A-G-N-L-A-S-G-G-A-A-G-A-T-
130 140 150
-S-L-C-F-V-Y-P-L-D-F-A-R-T-R-L-A-A-D-V-G-K-G-A-A-Q-
160 170
-R-E-F-T-G-L-G-N-C-I-T-K-I-F-K-S-D-G-L-R-G-L-Y-Q-G-
180 190 200
-F-N-V-S-V-Q-Q-I-I-Y-R-A-A-Y-F-G-V-Y-D-T-A-K-G-M-L-P-D

Pos. 1b Sequenz des Nukleotidcarrier-Säurespaltstücks A2

210 220
P-K-N-V-H-I-I-V-S-W-M-I-A-Q-T-V-T-A-V-A-G-L-
230 240 250
-V-S-Y-P-F-D-T-V-R-R-R-M-M-M-Q-S-G-R-K G-A-D-I-M-Y-
260 270
-T-G-T-V-D-C-W-R-K-I-A-K-D-E-G-P-K-A-F-F-K-G-A-W-S-
280 290
-N-V-L-R-G-M-G-G-A-F-V-L-V-L-Y-D-E-I-K-K-F-V-OH

λ_1

PCA-SER-LEU-LEU-THR-GLN-PRO-PRO-SER-VAL-SER-ALA-ALA-PRO-
GLY-GLN-LYS-VAL-THR-ILE-SER-CYS-SER-GLY-SER-SER-SER-ASN-
ILE-GLY-ASN-ASN-TYR-VAL-SER-TRP-TYR-GLN-GLN-LEU-PRO-GLY-
THR-ALA-PRO-ARG-LEU-LEU-ILE-TYR-GLU-ASN-ASP-LYS-ARG-PRO-
SER-GLY-ILE-PRO-ASP-ARG-PHE-SER-GLY-SER-LYS-SER-ASP-ALA-
SER-VAL-THR-LEU-GLY-ILE-THR-GLY-LEU-GLN-THR-GLY-LEU-GLN-
THR-ASP-GLU-ALA-ASP-TYR-TYR-CYS-GLY-THR-TRP-ASP-SER-SER-
LEU-SER-ALA-ALA-VAL-PHE-GLY-GLY-GLY-THR-LYS-LEU-THR-VAL-
LEU-GLY-GLN-PRO-LYS----SER-----LYS (Eulitz et al. 1974)

λ_3

SER-TYR-GLU-LEU-THR-GLN-PRO-PRO-SER----VAL-SER-VAL-SER-
PRO-GLY-GLN-THR-ALA-ARG-ILE-THR-CYS-SER-ALA-ASN-ALA-----
LEU-PRO-ASN-GLN-TYR-ALA-TYR-TRP-TYR-GLN-GLN-LYS-PRO-
GLY-ARG-ALA-PRO-VAL-MET-VAL-ILE-TYR-LYS-ASP-THR-GLN-ARG-
PRO-SER-GLY-ILE-PRO-GLN-ARG-PHE-SER-SER-SER-THR-SER-GLY-
THR-THR-VAL-THR-LEU-THR-LEU-THR-ILE-SER-GLX-VAL-GLN-ALA-
GLU-ASP-GLU-ALA-ASP-TYR-TYR-CYS-GLN-ALA-TRP-ASN-SER-
ALA-----SER-ILE-PHE-GLY-GLY-GLY-THR-LYS-LEU-THR-VAL-LEU-
GLY-GLN (Eulitz et al. 1987)

Pos. 2 Molekulare Mimikry - Primärstrukturen der mit dem SDS-AAC
kreuzreagierendem leichten Ketten des variablen Teils des
humanen IgG.

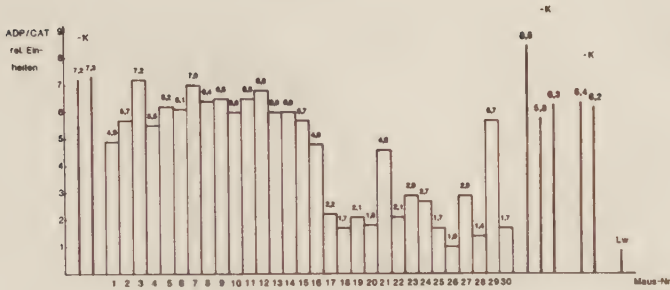
κ_2

ASP-ILE-VAL-MET·THR-GLN-SER-PRO-LEU-SER-LEU-PRO-VAL-THR-
PRO-GLY- GLU-PRO-ALA-SER-ILE-SER-CYS-ARG-SER-SER-GLN-SER-
LEU-LEU-HIS- SER-----ASP-GLY-PHE-ASP-TYR-LEU-ASN-TRP-TYR-
LEU-GLN-LYS-PRO- GLY-GLN-LEU-LEU-ILE-SER-ASN-ARG-ALA-SER-
GLY-VAL-PRO-ASP-ARG-PHE-SER-GLY-SER-GLY-SER-GLY-THR-
ASP-PHE-THR-LEU-LYS-ILE-SER-ARG-VAL-GLU-ALA-GLU-ASP-VAL-
GLY-VAL-TYR-TYR-CYS-MET-GLX-ALA-LEU-GLN-ALA-PRO-----ILE-
THR-PHE-GLY-GLN-GLY-THR-ARG-LEU-GLU-ILE (Putnam et al. 1973)

κ_3

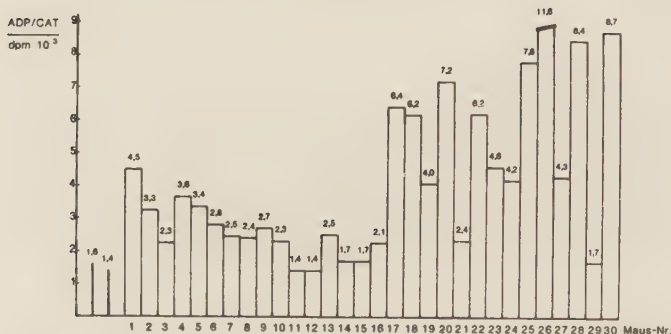
GLU-ILE-VAL-LEU-THR-GLN-SER-PRO-GLY-THR-LEU-SER-LEU-SER-PRO-
GLY-GLU-ARG-ALA-LEU-SER-CYS-ARG-ALA-SER-GLN-SER---VAL-SER-
ASN-SER-PHE-LEU-ALA-TRP-TYR-GLN-GLN-LYS-PRO-GLY-GLN-ALA-
PRO-ARG-LEU-LEU-ILE-TYR-VAL-ALA-SER-SER-ARG-ALA-TYR-GLY-ILE-
PRO-ASP-ARG-PHE-SER-GLY-SER-GLY-SER-GLY-THR-ASP-PHE-THR-
LEU-THR-ILE-SER-GLY-GLY-GLN-GLY-THR-LYS-VAL-GLU-LEU---LYS
(Kabat et al. 1987)

Pos.3 DAN-AMP-Fluoreszenztest



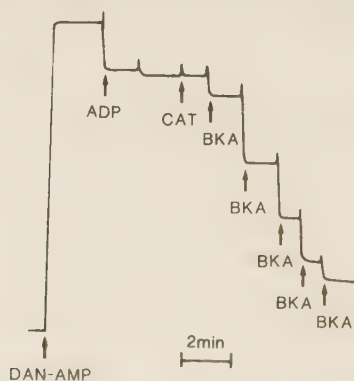
In dieser Abbildung wird die Hemmung des m-, c-Überganges im DAN-AMP-Fluoreszenztest nach Zugabe von CAT gezeigt. Dabei wird die Verringerung des Schreiberausschlages nach Zugabe von 20 μ M ADP und 17 μ M CAT in relativen Einheiten aufgetragen. Für jede Messung wurden 5 μ l 1 : 10 verdünnter pAk über Nacht mit Proteoliposomen inkubiert. Ordinate: Abnahme des Schreiberausschlages nach Zugabe von ADP und Carboxyatraktylat in cm als Maß für die Hemmung des m-, c-Überganges am AAC im DAN-AMP-Fluoreszenztestsystem; Abszisse: Kontrollen sind durch schmale Striche hervorgehoben. Lw: Leerwert; die Zahlen 1-30 bezeichnen die immunisierten Mäuse.

Pos. 4 Signifikanz der funktionellen Testsysteme



In dieser Abbildung wird die Hemmung des m-, c-Überganges gegenüber der Hemmung des ¹⁴C-ATP Austausches verrechnet. Dies dient dazu, die Signifikanz der funktionellen Hemmung in beiden Testsystemen zu verdeutlichen. Die Kontrollen sind durch dünne Striche markiert. Für beide Messungen wurden je 5 µl 1 : 10 verdünnte CAT-AAC-pAk eingesetzt.

Pos. 5 Einfluß von foetalem Rinderserum auf die DAN-AMP-Fluoreszenz-Messungen



A

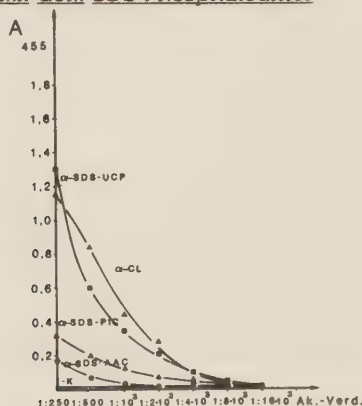
Abbildung A zeigt die Bindung von DAN-AMP an foetalem Rinderserum ohne rekonstituierten Nukleotidcarrier, sowie das Fluoreszenzverhalten nach Bindung von BKA. Es wurden 10 µM DAN-AMP, 20 µM ADP, 17 µM CAT und jeweils 5 µM Bonkregat (BKA) zugegeben.



B

Abbildung B (fortgesetzt) zeigt die Bindung von DAN-AMP, sowie den m-, c-Übergang mit rekonstituiertem Nukleotidcarrier nach Zugabe von prä-immunen Antikörpern und von funktionell hemmenden pAk. Der mittlere Graph zeigt die DAN-AMP-Fluoreszenz nach Zugabe von 5 μ l 1 : 10 verdünnten präimmunen Antikörpern einer 6 Wochen alten weiblichen F1 (Balb C x C57 BL6) Maus. Es wurden 10 μ M DAN-AMP, 20 μ M ADP, 17 μ M CAT und 5 μ M BKA zugegeben.

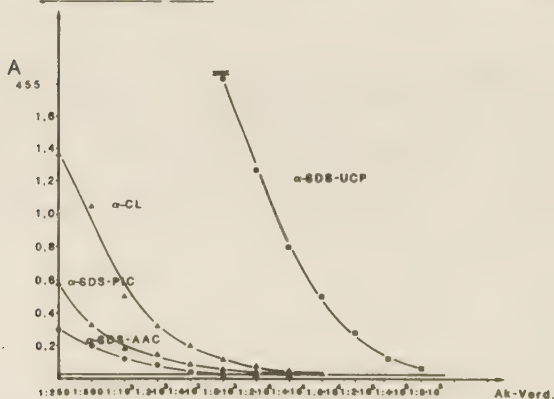
Pos. 6 Kreuzreaktivität verschiedener polyklonaler Antikörper nach Titration mit dem SDS-Phosphatcarrier



(●-●) R_D (SDS-AAC-pAk); (▲-▲) P_i (SDS-Phosphatcarrier-pAk-G); (Δ-Δ) CL^1 (Cardiolipin-pAk-1); (■-■) R^{11} (SDS-UCP-pAk).

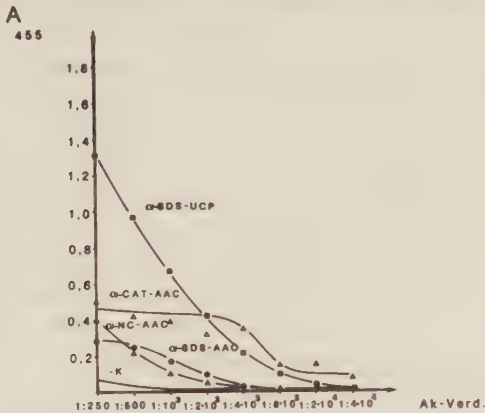
Für die in Position 6 u. 8 abgebildeten ELISA-Titrationen wurden die Mikrotiterplatten mit 4 µg/ml poly-L-Lysin vorbehandelt und jeweils mit 0,9 µg/ml SDS-Protein in Na-bicarbonat-Puffer pH 9,6 unter Zugabe von 0,005% SDS und 100 µM DTE beschichtet.

Pos. 7 Kreuzreaktivität verschiedener pAk nach Titration mit lyophilisiertem UCP



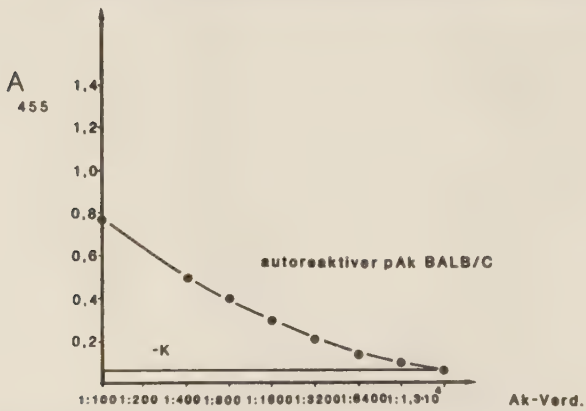
(●-●) R_D^1 (SDS-AAC-pAk-D); (▲-▲) P_i^G (SDS-Phosphatcarrier-pAk-G); (Δ-Δ) CL^1 (Cardiolipin-pAk-1); (■-■) R_{11} (SDS-UCP-pAk). Lyophilisiertes UCP (4 µg/ml) wurde mit Na-bicarbonat-Puffer (pH=9.6 + 100 µM DTE) ohne Zusatz von SDS beschichtet.

Pos. 8 Kreuzreaktivität verschiedener polyklonaler Antikörper nach Titration auf SDS-Neurospora crassa-AAC als Antigen



(■-■) SDS-UCP-pAk; (●-●) R_C^1 (SDS-AAC-pAk); (Δ-Δ) CAT-AAC-pAk; (▲-▲) SDS-NC-AAC-pAk. Die Mikrotiterplatten wurden mit 4 µg/ml poly-L-Lysin vorbeschichtet und anschließend jeweils mit 0.9 µg/ml SDS-denaturiertem *Neurospora-crassa*-AAC in Natriumbicarbonat-Puffer (pH = 9.6) unter Zugabe von 0.005% SDS und 100 µM DTE inkubiert.

Pos. 9 Autoreaktiver polyklonaler Antikörper gegen CAT-AAC



Die Elisa-Testplatte wurde mit 0,9 µg/ml Rinderherz-CAT-AAC bei einem Gewichtsverhältnis Triton zu Protein von 10 : 1 (4°C) beschichtet.

8. Literaturverzeichnis

- Adrian, G.S., McCammon, M.T., Montgomery, D. L. und Douglas, M. G. (1986) *Mol. Cell Biol.* 6, 626-634
- Allison, A.C. und Denman, A.M. (1976) *Br. Med. Bull.* 32, 124-129
- Aquila, H., Eiermann, W., Babel, W. und Klingenberg, M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 85, 549-560
- Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M. und Klingenberg, M. (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363, 345-349
- Aquila, H., Link, T. A. und Klingenberg, M. (1985) *EMBO* 4, 2369-2376
- Aquila, H., Link, T. A. und Klingenberg, M. (1987) *FEBS Lett.* 212, 1-9
- Arends, H. und Sebald, W. (1984) *EMBO* 3, 377-382
- Atassi, M. Z. (1975) *Immunochemistry* 12, 423-438
- Atassi, M. Z. (1978) *Immunochemistry* 15, 909-936
- Atassi, M. Z., Sakata, S. und Sakata, S. (1982) *Mol. Immunol.* 19, 1509-1512
- Atassi, M. Z. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145, 1-20
- Babel, W. (1978) Diplomarbeit, Universität München
- Baker, A. und Leaver, C. J. (1985) *Nucl. Acid Res.* 13, 5857-5866
- Battini, R., Ferrari, S., Kaczmarc, L., Calabretta, B., Chen, S.T. und Baserga, R. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 4355-4359
- Baum, H. und Palmer, C. (1985) *Mol. Aspects Med.* 8, 201-234
- Berg, P. A. und Baum, H. (1980) *Springer Semin. Immunopathol.* 3, 355
- Berg, P. A. und Klein, R. (1986) *Klin. Wochenschr.* 64, 897-909
- Bernardi, G. (1971) *Meth. Enzymol.* 22, 325-339
- Beyer, K. und Klingenberg, M. (1985) *Biochemistry* 24, 3821-3826
- Beyer K. (1988) *Biochemistry*, eingereicht
- Blair, P. V. (1967) *Meth. Enzymol.* 10, 78-81
- Blaser, K. und Heusser, C. H. (1984) *Eur. J. Immunol.* 14, 93-98
- Bogner, W., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1986) *Eur. J. Biochem.* 161, 611-620
- Bode, C., Cocbell, H. und Stähler, E. (1967) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 23, 555
- Botazzo, G. F., Todd, I., Mirakian, R., Belfiore, A. und Pujol-Borell, R. (1986) *Immunological Reviews* 94, 137-169
- Boulay, F., Lauquin, G. J. -M. und Vignais, P. V. (1986) *Biochemistry* 25, 7567-7571

- Brockhaus, M. (1985) *Immun. Meth.* III, 133-145
- Buchanan, B., Eiermann, W., Riccio, P., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1976) *PNAS* 73, 2280-2284
- Capaldi, R. A. (1988) *TIBS* 13, 144-148
- Carrasco, N., Tahara, S. M., Patel, L., Goldkorn, T. und Kaback, H. R. (1986) *BBA* 885, 201-210
- Cheneval, D., Müller, M., Toni, R., Ruetz, S. und Carafoli, E. (1983) *J. Biol. Chem.* 260, 13003-13007
- Cheneval, D. und Carafoli, E. (1988) *Eur. J. Biochem.*
- Daneels, G., Moeremans, M., De Raeymaeker, M. und De Mey, J. (1986) *Immun. Meth.* 89, 89-91
- Davidson, A., Chien, N., Frank, L., Halpern, R., Snapper, S., Zupko, K. und Diamond, B. (1986) *Cell. Immunol.* 99, 44-52
- De Blas, A. L. und Charwinski, H. M. (1983) *Anal. Biochem.* 133, 214-219
- Eiermann, W., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1977) *FEBS Lett.* 74, 209-214
- Eilat, D. (1982) *Mol. Immunol.* 19, 943-955
- Eulitz, M. (1974) *Eur. J. Biochem.* 50, 49-69
- Eulitz, M., Breuer, M. und Linke, R. P. (1987) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368, 863-870
- Everitt, E. und Maksimova, A. (1984) *Anal. Biochem.* 141, 17-24
- Fields, A. P., Bednarik, D. P., Hess, A. und May, S. (1988) *Nature* 333, 278-280
- Frazer, I. H., Mackay, I. R., Jordan, T. W., Wittingham, S., und Marzuki, S. (1985) *J. Immunol.* 135, 1739-1745
- Freisleben, H. J. und Zimmer, G. (1986) *Eur. J. Biochem.* 160, 155-161
- Fussey, S. P. M., James, O. F. W., Bassendine, M. F. (1988) *Lancet* 14, 1067-1070
- Gershoni, J. M. und Palade, G. E. (1983) *Anal. Biochem.* 131, 1-15
- Gershwin, M. E., Ahmed, A., Danner, D., Fregau, D., Van de Water, J., Leung, P. und Coppel, R. (1988) *FASEB J.* A869, 3334
- Gershwin, M. E., Mackay, I. R., Sturgess, A. und Coppel, R. (1987), *J. Immunol.* 138, 3521-3525
- Giusti, A. M., Chieu, N. C., Zach, D. J., Shin, S.-U. und Scharff, M. D. (1987) *PNAS* 84, 2926-2930
- Gosh, S. und Campbell, P. (1985) *Immunol. Today* 7, 217-222
- Greenwood, F. C., Hunter, W. M. und Glover, J. S. (1963) *Biochem. J.* 89, 114

- Helenius, A. und Simmons, K. (1972), J. Biol. Chem. 247, 3656
- Henningfield, M. F. und Swich, R. W. (1987) Biochem. Cell Biol. 65, 245-251
- Houldsworth, J. und Attardi, G. (1988) PNAS 85, 377-381
- Janoff, A. S. und Rauch, J. (1986) Chem. Phys. Lip. 40, 315-332
- Kaback, H. R. (1986) Ann. Rev. Biophys. Chem. 15, 279-319
- Kabat, E. A. und Wu, T. T. (1987) Sequences of Immunological Interest. NIH US Dept. of Health and Human Services, Bethesda
- Kasahara, M. und Hinkle, P. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7384-7390
- Kawai, C., Matsamori, A. und Fujiwara, H. (1987) Ann. Rev. Med. 38, 221-239
- Kearny, J., S., Radbruch, A., Liesegang, B. und Rajewsy, K. (1979) J. Immunol. 123, 1548
- Kelsoe, F. und Stout, J. T. (1986) Cell Immunol. 98, 506-516
- Kishore, N., Shah, D., Shanes, V. M. und Levine, R. P. (1988) Mol. Immunol. 25, 811-819
- Klein, J. (1975) "Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex", Principles and Immunogenetics Appeal to a Single System. Springer Verlag Berlin/Heidelberg/N. Y., S.89
- Klingenberg, M. (1976) in "The Enzymes of Biological Membranes. Membrane Transport", Vol. 3 (Hrsg. Martonosi, A. N.) Plenum Publ. Corp. New York/London, S. 383-438
- Klingenberg, M. (1975) in "Mitochondria, Bioenergetics, Biogenesis, and Membrane Structure" (Hrsg. Packer, L. und Gomez-Puyou, A.) Acad. Press, New York/London, S. 127-149
- Klingenberg, M. und Aquila, H. (1982) Tokai J. Exp. Clin. Med. 1, Suppl. 43-49
- Klingenberg, M., Mayer, I. und Dahms, A. S. (1984) Biochemistry 23, 2442-2449
- Klingenberg, M. (1986) Meth. Enzymol. 125, 618-630
- Klingenberg, M. Herlt, M. und Winkler, E. (1986) Meth. Enzymol. 126, 498-504
- Klingenberg, M. (1985) Biochemistry 24, 3650-3659
- Klingenberg, M. und Lin, C. S. (1986) Meth. Enzymol. 126, 490-498
- Klingenberg, M. (1986) Meth. Enzymol. 125, 618-630
- Klinman, N. R., Sigal, N. H., Metcalfe, E. S., Pierce, S. K. und Gearheart, P. J. (1977) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 165-173

- Knirsch, M. (1988) Diplomarbeit, Universität München
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975) *Nature* 256, 495
- Kolarov, J. (1978) *FEBS Lett.* 96, 373-376
- Krämer, R. und Klingenberg, M. (1977) *FEBS Lett.* 82, 863-867
- Krämer, R. und Klingenberg, M. (1979) *Biochemistry* 19, 556-560
- Krämer, R. und Klingenberg, M. (1982) *Biochemistry* 21, 1082-1089
- Krebs, J. J. R., Hauser, H. und Carafoli, E. (1979) *J. Biol. Chem.* 354, 5308-5316
- Khyse-Andersen, J. J. (1984) *Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209
- Kyriatsoulis, A., Manns, M., Roth, U., Gerken, G., Lohse, A., Wollensak, S., Reske, K. und Meyer zum Büschenfelde, K. H. (1988) *J. Immunol. Meth.* 109, 113-121
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685
- Leuven, F. V., Marynen, P., Cassimon, J. -J. und den Berghe, H. V. (1988) *J. Immunol. Meth.* 111, 39-49
- Lin, C. S. und Klingenberg, M. (1982) *Biochemistry* 21, 2950-2956
- Lin, W. und Kasamatsu, H. (1983) *Anal. Biochem.* 128, 302-311
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, A. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265
- Luzuy, S., Merino, J., Schurmans, S. und Lambert, P. -H. (1988) *Biochem. Soc. Trans.* 16, 147-149
- Maisch, B., Decq, P., Liebau, G. und Kochsiek, K. (1983) *Ann. J. Cardiol.* 52, 1072-1078
- Mayer, I., Dahms, A. S., Riezler, W. und Klingenberg, M. (1984) *Biochemistry* 23, 2436-2442
- Mendel-Harwig, I. und Nelson, B. D. (1983) *J. Bioenerget. Biomembranes* 15, 27-36
- Mendlovic, S., Brocke, S., Shoenfeld, Y., Ben-Bassat, M., Meshores, A., Bakimer, R. und Mozes, E. (1986) *PNAS* 85, 2260-2264
- Meyer, I., Jack, H. M., Ellis, N. und Wabl, M. (1986) *PNAS* 83, 6950-6953
- Morgan-Hughes, J. A. (1986) *TINS* 9, 15-19
- Neckelmann, M., Li, K., Wade, R. P., Schuster, R. und Douglas, D. C. (1984) *PNAS* 84, 7580-7584
- Neu, N., Beisel, K. W., Traystman, M. D., Rose, N. R. und Craig, S. W. (1987) *J. Immunol.* 138, 2488-2493
- Neuhoff, V., Stamm, R. und Eibl, H. (1985) *Elektrophoresis* 6, 427-448

- O' Callahan, C. M. und Hosey, M. M. (1988) *Biochemistry* 27, 6071-6077
- Padlan, E. A., Cohen, G. H. und Davies, D. R. (1985) *Ann. Immunol. (Paris)* 136C, 271-276
- Putnam, F. W., Whitley, E. J., Pahl, C. und Davidson, J. N. (1973) *Biochemistry* 12, 3763-3780
- Pisetzky, D. S. und Peters, D. V. (1982) *J. Immunol. Meth.* 41, 187-200
- Rasmussen, U. B. und Wohlrab, H. (1986) *BBRC* 138, 850-857
- Rauch, J., Tannenbaum, H., Stollar, B. D., Schwartz, R. S. (1984) *Eur. J. Immunol.* 14, 529-534
- Reggiardo, Z., Vasquez, E. und Schnaper, L. (1980) *J. Immunol. Meth.* 34, 55-60
- Riccio, P., Scherer, B. und Klingenberg, M. (1973) *FEBS Lett.* 31, 11
- Ridley, R. G., Patel, H. V., Parvett, C. L. Y., Olynk, K. A., Reichling, S. und Freeman, K. B. (1987) *Bioscience Reports* 6, 87-94
- Rose, N. R., Herskowitz, A., Neumann, D. A. und Neu, N. (1988) *Immunology Today* 9, 117-120
- Runswick, M. J., Powell, S. D., Nygren, P. und Walker, J. E. (1987) *EMBO J.* 6, 1367-1373
- Sablitzky, F., Radbruch, A. und Rajewsky, K. (1982) *Handbook of Experimental Immunology*, Kap. 110. 1, S.59-71, Weir und Herzenberg, 4. Ausgabe, Oxford London/Melbourne/Edinborough
- Sanz, I. und Capra, J. D. (1988) *J. Immunol.* 140, 3283-3285
- Sarasta, M. und Walker, J. E. (1982) *FEBS Lett.* 144, 250-254
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* 166, 368-379
- Schlerf, A., Droste, M., Winter, M. und Kadenbach, B. (1988) *EMBO J.* 7, 2387-2391
- Schultheiß, H. P. und Klingenberg, M. (1982) *Electrophoresis* 6, 599-606
- Schultheiß, H. P., Schwimmbeck, P. und Bolte, H. D. (1984a) *Adv. Myocard.* 6, 311-325
- Schultheiß, H. P., Bjerrum, P. J. und Klingenberg, M. (1984b) *Biochim. Biophys. Acta* 771, 235-240
- Schultheiß, H. P. und Klingenberg, M. (1984c) *Eur. J. Biochem.* 143, 599-605
- Schultheiß, H. P., Schulze, K., Kühl, U., Ulrich, G. und Klingenberg, M. (1986) *Annals N. Y. Acad. Sci* 44-63
- Schultheiß, H. P. und Klingenberg, M. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 239, 273-279

- Shlomchik, M. J., Aucoin, A. H., Pisetzky, D. S. und Weigert, M. G. (1987) PNAS 84, 9150-9154
- Steward, M. W. und Lew, A. M. (1985) J. Immunol. Meth. 78, 173-190
- Stott, D. I., Merino, J., Schurmans, S. und Lambert, P. H. (1988) Biochem. Soc. Trans. 16, 147-149
- Suske, G., Mengel, T., Cordingley, M., und Kadenbach, B. (1987) Eur. J. Biochem. 168, 233-237
- Tardieu, M., Powers, M. L., Hafler, D. A., Hauser, S. L. und Weiner, H. L. (1984) Eur. J. Immunol. 14, 561-565
- Thammana, P. und Scharff, M. D. (1983) Eur. J. Immunol. 13, 614-619
- Thomas, H. C. und Epstein, O. (1980) Springer Semin. Immunopath. 3, 375
- Tobwin, H. und Gordon, J. (1984) J. Immunol. Meth. 72, 313-340
- Traub, O., Loch, J., Paul, D. und Willecke, K. (1987) Eur. J. Cell. Biol. 43, 48-54
- Van de Water, J., Gershwin, M. E., Leung, P., Ansari, A. und Coppel, R. L. (1988) J. Exp. Med. 167, 1791-1799
- Vignais, P. V., Block, M. R., Boulay, F., Brandolin, G. und Lauquin, G. J. -M. (1985) Structure and Properties of Cell Membranes, Vol. II, CRC Press, S. 139-179
- Wabl, M., Barrows, P. D., Gabain, A. V. und Steinberg, C. (1985) PNAS 82, 479-482
- Wells, M. A. und Hanakian, D. J. (1969) Meth. Enzymol. 14, 178-184
- Wilson, C. M. (1979) Anal. Biochem. 96, 263-278
- Yeaman, S. J., Danner, D. J., Mutimer, D. J., Fussey, S. P. M., James, O. F. W. und Bassendine, M. F. (1988) Lancet 14, 1067-1070
- Zanetti, M. (1986) Immunol. Invest. 15, 287-310

Lebenslauf

Bernhard-Maria Seitner,
8 München 60, Nimmerfallstraße 82

geb. am 3. 7. 1954 in Nürnberg

Eltern: Konrad Seitner, Richter +
Irmgard Seitner, geb. Mulzer

Sept. 1961 - Juli 1965	Grundschule in Nürnberg
Sept. 1965 - Juni 1974	Hans-Sachs Gymnasium in Nürnberg
Juli 1974 - Okt. 1974	Wehrdienst/Grundausbildung
Nov. 1974 - Mai 1981	Studium Biologie/Chemie für höheres Lehramt an der Universität Erlangen-Nürnberg
Mai 1981	Diplomprüfung
Juni 1981 - Dez. 1981	Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg, Abteilungsleiter: Frau Prof. H. Kersten
Jan. 1982 - Juni 1982	Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Immunologie der Universität Erlangen-Nürnberg
Juli 1982 - Juni 1983	Ableistung des restlichen Wehrdienstes
Sept. 1983 - Mai 1988	Doktorarbeit am Institut für Physikalische Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Leitung: Prof. Dr. M. Klingenberg
seit Mai 1987	Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissen- schaftlichen Assistenten

